

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA LA
SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE GLICOESTRUCTURAS
DE INTERÉS BIOLÓGICO EN CONDICIONES
SOSTENIBLES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carlos Santiago Bayón Sánchez

Bajo la dirección del doctor

María José Hernáiz Gómez-Degano

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**“OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA LA SÍNTESIS
ENZIMÁTICA DE GLICOESTRUCTURAS DE INTERÉS
BIOLÓGICO EN CONDICIONES SOSTENIBLES”**



TESIS DOCTORAL

Por:

CARLOS BAYÓN SÁNCHEZ

Realizada en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

Directora: Dra. María José Hernáiz Gómez-Dégano

Madrid, 2013



*Prof. Dra. D^a. María J. Hernáiz GómezDégano, Profesor Titular.
Dpto de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Univ. Complutense de Madrid.
Ciudad Universitaria, Plaza de Ramón y Cajal, s/n.
E-28040 MADRID, ESPAÑA.
Tel. n^o. +34-913941821. Fax n^o. +34-913941822.
E-mail: mjhernai@ucm.es
<http://www.ucm.es/info/btg/>*

D^a. MARÍA JOSÉ HERNÁIZ GÓMEZ-DÉGANO, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y Directora del Grupo de Investigación Biotransformaciones de la UCM (920227)

HACE CONSTAR:

Que el trabajo presentado por D. Carlos Bayón Sánchez para aspirar al grado de Doctor con título: “Obtención de biocatalizadores para la síntesis de glicoestructuras de interés biológico en condiciones sostenibles”, reúne, bajo mi punto de vista, las características necesarias para alcanzar dicho objetivo, pues, en primer lugar, presenta claramente los Objetivos por alcanzar, que posteriormente son desarrollados de forma completa por lo que respecta a Resultados y Discusión y explicados de manera clara en la sección de Materiales y Métodos. A la luz de lo expuesto en la Tesis Doctoral, es evidente que el doctorando domina correctamente las Técnicas Experimentales empleadas, y por otra parte, la Bibliografía empleada es amplia y bien actualizada.

El trabajo es muy valioso pues utiliza diferentes tipos de enzimas para las síntesis de glicoestructuras con interés biológico en condiciones sostenibles y su posteriormente implicación en procesos reconocimiento molecular.

Por todo ello informo muy favorablemente acerca de la mencionada Tesis Doctoral, por lo que bajo mi opinión procede la exposición y defensa de la misma.

Prof. Dra. D^a María José Hernáiz Gómez-Dégano

Parte de los resultados que se expresan en esta Memoria han sido expuestos en diferentes congresos nacionales e internacionales y han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Publicaciones

Bayón, C., Cortés-Cabrera, A., Berenguer, J., Hernáiz, M.J. *Highly efficient enzymatic synthesis of Gal β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc and Gal β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc in ionic liquids.* Tetrahedron 69 (2013), pp. 4973-4978

Bayón, C., Cortés-Cabrera, A., Aires-Trapote, A., Civera, C., Hernáiz, M.J. *Highly efficient and regioselective enzymatic synthesis of β -1 \rightarrow 3 galactosides in biosolvents.* Aceptado en revista RSC Advances. In Press.

Treviño, J., **Bayón, C.,** Ardá, A., Marinelli, F., Gandolfi, R., Molinari, F., Jimenez-Barbero, J., Hernáiz, M.J. *New Insights into the Glycopeptide Antibiotics Binding to Cell Wall Precursors using SPR and NMR spectroscopy.* Enviado.

Sandoval, M., Navarrete, S., **Bayón, C.,** Langerwisch, U., Berenguer, J., Mateo, C., Guisán, J., Hernáiz, M.J. *Immobilization of β -galactosidase from *Thermus thermophilus* onto agarose supports for N-acetyllactosamine synthesis in presence of ionic liquids.* Enviado.

Congresos

Bayón, C., Navarrete, S., Ruiz, L., Sandoval, M., Berenguer, J., Hernáiz, M.J. *High-yield enzymatic synthesis of gal β -(1 \rightarrow 3) galnac and gal β -(1 \rightarrow 3) glcnac using recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*.* ICS 2012. 26th International Carbohydrate Symposium. Madrid. España. Comunicación oral.

Bayón, C., Treviño, J., Ardá, A., Gandolfi, R., Marinelli, F., Molinari, F., Jimenez-Barbero, J., Hernáiz, M.J. *Binding of glycopeptide antibiotics to cell wall analogs using SPR and NMR spectroscopy.* ICS 2012. 26th International Carbohydrate Symposium. Madrid España. Poster.

Ruiz, L., Navarrete, S., Sandoval, M., **Bayón, C.,** Aires, A., Rumbero, A., Berenguer, J., Hernáiz, M.J. *Influence of green solvents on enzymatic activity of free and immobilized TTP0042 recombinant β -galactosidase from *Thermus thermophilus*.* ICS 2012. 26th International Carbohydrate Symposium. Madrid. España. Poster.

Aires, A., Muelas, D., **Bayón, C.,** Treviño, J.;Ardá, A., Jimenez-Barbero, J., Rumbero,A., Hernáiz, M.J. *Synthesis of new glycodendrimers by click chemistry and binding studies.* ICS 2012. 26th International Carbohydrate Symposium. Madrid (Spain). Poster y Comunicación Flash presentada por Aires, A.

Manuel Sandoval, **Carlos Bayón**, Sergio Navarrete, Álvaro Cortés-Cabrera, Pedro Lozano, José Berenguer, José V. Sinisterra, María J. Hernáiz. “Influence of ionic liquids on enzymatic synthesis of β -galactosidases: a Surface Plasmon Resonance and molecular modeling analysis”. Biotrans 2011. Sicilia. Italia. 10th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations.

Bayón, C., Aires, A., Sandoval, M., Zambelli, P., Rumero, A., Sinisterra, J.V., Hernáiz, M.J. “Influence of green solvents on enzymatic activity of free and immobilized β -galactosidases from *Bacillus circulans*”. APIB 2011. Active Pharmaceutical Ingredients from Biotechnology: from research to industrial and regulatory issues

Sergio Navarrete Serradilla, Laura Ruiz Ruiz Paolo Zambelli Manuel Sandoval Barrantes **Carlos Bayón Sánchez**. “Síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados de interés terapéutico”. VII Jornadas de Investigación de pregrado en Cc. de la Salud. UCM 2011

Carlos Bayón Sánchez, Javier Tomé Alcalde, María José Hernáiz Gómez-Dégano, José Vicente Sinisterra Gago. “Búsqueda de nuevas glicosidasas. Caracterización de una nueva β -fucosidasa de *Cellulomonas gelida*”. Poster. III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. 2010. Alcalá de Henares. (España)

Bayón, C., Hernáiz, M.J., Sinisterra, J.V. “Detection and purification of a new β -fucosidase enzyme in *Cellulomonas gelida*” Poster. Biotrans 2009. Berna (Suiza). 9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. Oviedo. Bern. Switzerland.

Almendros M., **Bayón C.**, Afonso D., Fernandez-Lucas J., Clavijo E., de Regil R., Martín-Gonzalez I., Hernáiz M.J., Sinisterra J.V. “New microorganisms active in the production of enzymes with industrial interest”. 4th International Congress on Biocatalysis (Biocat 2008). Hamburg. Germany. Aceptado como comunicación oral.

Trujillo R., Pelaez P.P., **Bayón C.**, Sinisterra J.V. “New lipase producer microorganisms isolated from Peruvian Amazonia”. Poster. Biotrans 2007. 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. Oviedo. Spain.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. María José Hernáiz, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y Directora del Grupo de Biotransformaciones, por la dirección de este trabajo, por su confianza y por su paciencia, por haberme guiado por el mundo de la ciencia y la investigación, y sin la cual, esta Tesis nunca se hubiera podido realizar.

Al Dr. José Vicente Sinisterra, anterior Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Director del Grupo de Biotransformaciones y Director del Servicio de Biotransformaciones del Parque Científico de Madrid, por acogerme en el grupo de investigación, por su confianza, su guía y sus consejos, no solo en ciencia, sino en la vida misma..

Al Dr. Andrés Alcántara, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y Director del Grupo de Biotransformaciones, por su apoyo, por todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo, por su simpatía y buen humor, capaz de iluminar el laboratorio solo con una frase.

A la Dra. Isabel de la Mata, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, por tutelar este trabajo, y al Dr. Miguel Arroyo, Profesor del mismo Departamento, por su disposición para ayudarme en todo momento.

A la Dra. Amalia Rodríguez Bayón, por su confianza y su apoyo, aunque no pudo llegar a ver esta Tesis terminada, confío en que pudiera sentirse orgullosa.

A todos los Profesores del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, en especial al Dr. José María Sánchez-Montero, Dra. María Fernández, Dra. María Teresa Ramos, Dra. Pilar López-Alvarado, Dra. Mercedes Villacampa, Dra. Mercedes Grande, Dra Nieves Cabezas, Dr. Giorgio Giorgi, Dr. Juan Francisco González, y al personal no docente, Ana, Jesús y Marisa, todos ellos siempre me han ayudado y animado durante estos años.

Al Dr. José Berenguer, Director del Laboratorio de Biotecnología y Genética de Bacterias Termófilas Extremas del Centro de Biología Molecular–Severo Ochoa, por recibirme en su laboratorio para realizar algunos de los apartados más importantes de esta Tesis, por su cercanía, por sus consejos y orientación. También quisiera expresar mi agradecimiento a su excelente equipo, por su ayuda y por hacerme sentir como uno más en su laboratorio: al Dr. Aurelio Hidalgo, siempre dispuesto a ayudarme para encontrar la solución a los problemas, a Eloy, Emilio, Carlos, Carol, Akbar, Alba, Noé, Esther, Mariajo y en especial, a Laura, eje motor de ese grupo, por su disponibilidad total, su ayuda sin condiciones y su amistad.

Al Dr. Ángel Rumbero, Profesor Titular de la Facultad de Ciencias de la Universidad, Autónoma de Madrid, por haberme recibido en su laboratorio y sobre todo por su inestimable ayuda y consejos en los procesos de síntesis química y de interpretación de Resonancia Magnética Nuclear. A su equipo, David, Rubén y en especial, a Antonio, quien me ha ofrecido siempre su ayuda desinteresada y gracias a él he podido solucionar más de una situación imposible, y por lo más importante, su amistad.

Al Dr. Francesco Molinari, Profesor de la Sección de Microbiología Industrial del Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentaria y Microbiológica, Universidad de Estudios de Milán (Italia), por recibirme en su laboratorio y por la colaboración entre nuestros grupos de Investigación, por la confianza que siempre ha depositado en mí y por hacer que la ciudad de Milán ocupe un hueco importante en mi corazón.

Al Dr. Woody Fessner, Profesor del Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Universidad Técnica de Darmstadt (Alemania), por acogerme en su laboratorio para llevar a cabo la funcionalización de glicodendrimeros. A todo su equipo, en especial a la Dra. Ning He, por su paciencia y sus consejos.

A la comunidad de españoles que me adoptaron durante mi estancia en Darmstadt, en especial a Juan, Leo y Jorge, por haberme hecho sentir en familia en todo momento. Gracias.

A todas las personas con las que he tenido la oportunidad de coincidir en el Parque Científico de Madrid, desde su propio personal, Rubén, Mota, Laura, Oscar y en especial Gustavo. A las distintas empresas allí alojadas: de ProAlt, Juan, José, Carmen, Paula, Laura y muy especialmente a Mari, por su ayuda, enseñanzas, apoyo y su amistad. A las chicas de Decantum, Ana y Macu, por todos sus consejos y por los buenos momentos que hemos pasado.

A mis compañeros del Servicio de Biotransformaciones, a Marcos, mi primer compañero de Doctorado, que tantas cosas hemos pasado juntos, a Nacho, José y Clara, y especialmente a Tomé, gran amigo y mejor persona, y Sara, por su paciencia, ayuda y entrega por los demás, todo un ejemplo a seguir.

A mis compañeros de laboratorio de la Facultad de Farmacia, empezando por mis predecesores, Javi, María y Pilar, por su guía, consejos, apoyo y amistad. A Manuel, por sus enseñanzas. A Mario, por su ayuda en esta última etapa. A Laura y Sergio por su colaboración en esta Tesis. A los alumnos extranjeros, Paolo, Roberta, las Alessandras, Spela, por los buenos momentos. Al resto de alumnos del Departamento, Ricardo, Fran, Lena, la comunidad italiana e india, y en especial, a Vero, por su ayuda desinteresada y su apoyo.

Agradecimientos

A mi maestro y amigo Manu, que me inició en el mundo de la investigación y me enseñó todo lo que sé sobre microbiología y otras tantas artes.

A mis amigos de la Carrera, en especial a Marta, modelo de esfuerzo y perseverancia, seguir su ejemplo ha hecho que esta Tesis exista, a Irene y Carlos, mis dos fantásticos, amigos como ellos no se encuentran fácilmente, a Inés y Alfonso, por todos esos incontables momentos, en breve seremos familia, a Jorge y Cris, cuando la amistad es para siempre, no importa dónde estemos cada uno, a Nuria, por su apoyo en todo momento. A todos los demás, que son tantos que no les puedo nombrar.

Al grupo de Doctorandos del Departamento de Zoología, por los buenos momentos, por su amistad, y sobre todo, por la comprensión, en especial a Sheila, Luis, Bea, Sofía, Samu, Antón, Pablo, Miren, Jasper, Joaquín y todos los demás.

A mis amigos de toda la vida, Lorenzo y Javi, porque nos veamos más o nos veamos menos, parece que no pasa el tiempo.

A Ale, mi amigo, mi hermano, por todos los momentos que hemos pasado juntos a lo largo de estos años, por comprenderme y por estar ahí siempre. A Sandra y Alfredo, por su amistad. A Odín y su Canal, por los buenos ratos que me han hecho pasar.

A los padres de Cristina, José y Lola, por acogerme en su familia desde el primer día, por hacerme sentir como en casa siempre. A Adela, por su simpatía y amistad, por su disposición a ayudarme en todo momento.

A mi familia, en especial a mi madrina, siempre pendiente de mí, y a mi abuela, que le habría encantado poder ver este momento.

A mis gatas, Nix y Lilith, por su compañía y porque sus ronroneos cuando se subían sobre mis piernas mientras escribía eran el mejor bálsamo, aunque ellas no lo supieran (o sí).

A Cristina, por su apoyo incondicional, por su cariño sin medida, por estar ahí siempre, con una sonrisa en los momentos buenos y con una sonrisa mayor en los malos, por aguantarme en estos meses de locura, y por tantas cosas que no podría terminar de escribir, así que lo resumiré en una: por ser ella.

A mis padres. No hay palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí a lo largo de mi vida. Su cariño sin fin, su apoyo en todo, incluso en las ideas más extrañas, como estudiar Biología. Siempre preocupados por darme lo mejor, ellos han hecho que me haya convertido en la persona que soy. Jamás podría devolverles ni una pequeña parte de todas las cosas que les debo, así que les dedico lo más valioso que he conseguido, esta Tesis, fruto de todo el esfuerzo y confianza que han depositado en mí, y es que es tan suya como mía.

“Una obra nunca se termina, solo se abandona”
Leonardo da Vinci

“Qué extraño destino sufrir tanto miedo y tanta duda por algo tan pequeño”
El Señor de los Anillos. J.R.R. Tolkien

A Cristina

A mis padres

ABSTRACT

Obtaining of biocatalysts for the enzymatic synthesis of biologically interesting glycostructures in green conditions

Introduction

Glycostructures present on the cell surface are involved in many biological processes such as cell-cell recognition and communication, growth regulation and antibody interaction, bacterial and viral infection and other crucial intercellular recognition events.(Hakomori 2004; Niederer *y col.* 2005; Yanagisawa *y col.* 2009; Yagi *y col.* 2010). An example of a key carbohydrate structure is galacto-N-biose (Gal- β -(1-3)-GalNAc) which is integrated in the Tn antigen that is associated to carcinoma cells, or lacto-N-biose (Gal- β -1-3-GlcNAc), the critical disaccharide of Lewis antigen (sLea), which has been reported to be a ligand in metastasis of cancer cells.(Springer 1984; Takada *y col.* 1993; Rapoport *y col.* 2003; Holeman *y col.* 2004; Caines *y col.* 2008; Shirato *y col.* 2008; Mandal *y col.* 2010). As well, sialic acids such as *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) or *N*-glycolylneuramic acid (Neu5Gc), are naturally occurring as the most abundant outermost carbohydrates in vertebrates or as cell-surface components in certain types of bacteria (Malykh *y col.* 2001; He *y col.* 2011).

The study of molecular processes involving carbohydrates requires the development of tools for multivalent presentation. Multivalency, defined as the multiple and simultaneous interaction between two systems (molecular aggregates, viruses, cell surfaces, etc.), entails a large increase of the binding affinity, compared to its monomeric equivalent (Krishnamurthy *y col.* 2006). Glycodendrimers are among the most used multivalent systems, and are very interesting for the efficient multivalent presentation of biological ligands, such as carbohydrates (Munoz *y col.* 2009).

Lipoglycopeptides are an important class of glycostructures with antibiotic function produced by actinomycetes. They act by blocking the synthesis in bacterial cell walls, by binding the peptidoglycan precursors (Nicolaou *y col.* 1999). Vancomycin and teicoplanin have been in clinical use since 1958 and 1988, respectively. They still represent the drugs of last resort against multi-resistant enterococci and methicillin resistant staphylococci (Parenti *y col.* 1978). The emergence of resistance to lipoglycopeptides among enterococci and more recently, the occurrence of the first two highly vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolates, has prompted the search for second generation drugs of this class (Gandolfi *y col.* 2007; Perichon *y col.* 2009).

There is a great interest in the synthesis of glycostructures in order to deepen our knowledge of their biological functions. Organic chemical methods for obtaining them have been developed, but they involve several elaborate protection and deprotection procedures and the use of toxic reagents (Lemieux *y col.* 1975; Schmidt *y col.* 1980; Paulsen 1982; Khare *y col.* 1985; Schmidt 1986; Wilstermann *y col.* 1995). Furthermore, biocatalysis is an attractive prospect for the synthesis of compounds in mild reaction conditions, biodegradable and environmentally acceptable catalyst, and tend to occur with high regio-, chemo- and stereoselectivity (Sheldon *y col.* 2004; Alcalde *y col.* 2006). To perform the enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates can be used mainly three types of enzymes: glycosidases, glycosynthases and glycosyltransferases (Perugino *y col.* 2004).

Recently, green solvents have received increasing attention as new co-solvents for biocatalytic organic synthesis in general, and in carbohydrate chemistry in particular because of their less toxic properties. It has been shown that the use of this kind of solvents, such as solvents derived from biomass or ionic liquids (ILs), as co-solvents in the enzymatic reaction, lead to a variation of the enzyme activity. (Ryu *y col.* 1992; Tawaki *y col.* 1992; Kamat *y col.* 1993; Wescott *y col.* 1993; Hernaiz *y col.* 2010; Perez *y col.* 2010; Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, *y col.* 2011; Pérez-Sánchez, Sandoval, *y col.* 2011; Perez-Sanchez *y col.* 2012; Sandoval *y col.* 2012)

Objectives

1. Search for glycosidase producing mesophilic and thermophilic microorganisms useful in the synthesis of biologically interesting oligosaccharides.
2. Cloning and characterization of the β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382 applied to the synthesis of biologically interesting disaccharides.
3. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides (Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc) using the β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382 in the presence of green solvents.
4. Structural analysis by fluorescence spectrometry and molecular modelling of the effect of green solvents on reactions catalyzed by the β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382.
5. Immobilization of the β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382 using different approaches (macroporous polymers activated with epoxide groups and glyoxyl agarose activated with aldehyde groups).
6. Obtaining of glycosynthases useful in the synthesis of glycoconjugates (β -Gal-3 from *Bacillus circulans* ATCC 31382 and D327G TmGalA *Thermotoga maritima*) and characterization of the effect of green solvents on enzyme activity.
7. Using of glycosyltransferases or sialyltransferases (α 2,6SiaT and, α 2,3SiaT *Photobacterium* sp) for the synthesis of sialic acid functionalized glycodendrimers.

8. Enzymatic modification using glycosidases, lipases, proteases and oxidases of different glycopeptide antibiotics: Teicoplanin, Mideplanin, Dalbavancin, MDL-63,426 y A-40926.
9. Study of glycopeptide antibiotics interactions with bacterial peptidoglycan precursors and hydrophobic chains using Surface Plasmon Resonance (SPR).

Chapter 1: Search for glycosidases useful for the synthesis of biologically interesting oligosaccharides

A screening for glycosidase producing microorganisms had been developed from a bacteria collection composed by 122 mesophilic organism. A β -fucosidase enzyme from *Cellulomonas gelida* was purified and characterized for the first time. The production of this enzyme was inducible by cellobiose and showed high activity for the hydrolysis of β -fucose residues in mesophilic conditions (309.63 IU/mg).

A search for glycosidases and glycosyltransferases was carried out in the genome of the thermophilic bacteria *Thermus thermophilus* PRQ25. Six putative genes were cloned in *E. coli* BL21 and *E. coli* Rosetta-Gami2, resulting in the proper production of all of them. The activity of the six enzymes was characterized, obtaining for the first time an α -glucosidase from this bacteria strain. The enzyme showed high activity in the hydrolysis of α -glucose residues in thermophilic conditions (257 IU/mg).

Chapter 2: Synthesis of biologically interesting disaccharides using glycosidases

The β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382 had been cloned in *E. coli* BL21. Its optimal reaction conditions were studied, obtaining an optimum pH of 6 and a temperature of 37 °C in 50 mM sodium buffer. In transglycosylation reactions, the enzyme was able to synthesize Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-

GalNAc using *p*NP- β -Gal as donor and GlcNAc or GalNAc as acceptors, showing a maximum yield of 51% and 49% respectively for each disaccharide after 3 h.

The effect of green solvents, such as solvents derived from biomass and ionic liquids (ILs), as reaction co-solvents was analyzed. Solvents derived from biomass enhanced the specificity of the transglycosylation reaction catalyzed by β -Gal-3 towards the synthesis, reaching a yield in the production of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc of 99 and 95% respectively with the solvent S13 (a dimethylamide derivative), detecting an optimal concentration of the co-solvent of 2 M. Moreover, ILs used as co-solvents in transglycosilation reaction also increases the yield of the synthesis of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc, obtaining the best result with [Bmim][PF₆], which showed a yield of 97% in the synthesis of both disaccharides, with an optimal concentration of the co-solvent of 30%.

An scaling up process of the disaccharides Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc production, using the enzyme β -Gal-3 in presence of the solvent derived from biomass S13 and the IL [Bmim][PF₆], was developed. We set up the conditions for the recovery of co-solvents, allowing their reuse, and the separation of the different reaction products, obtaining a final product yield after purification of 85% of β (1-3) disaccharide with S13 and 88% with [Bmim][PF₆].

The effect of solvent S13 and [Bmim] [PF₆] on the β -Gal-3 structure was studied by molecular modelling techniques and fluorescence spectroscopy. Using concentrations of 2 M and 30% respectively, these co-solvents cause structural modifications which increase the affinity of the substrate for the active site of the enzyme, and decrease the affinity of the aqueous phase for them, increasing the time that they remain located in optimal reaction distance.

β -Gal-3 enzyme had been immobilized using two different strategies: macroporous polymers activated with epoxy groups, and glyoxyl agarose activated with aldehyde groups, obtaining the best results with the latter. Immobilization of the enzyme on

glyoxyl agarose support was total and showed a maintenance of the activity of 86% compared to the free enzyme, carrying out the process of immobilizing the stabilizing agent in the presence of PEG-600. Transglycosylation reactions were carried out using immobilized β -Gal-3 on glyoxyl agarose for the synthesis of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc. Yields obtained in only buffer were 34 and 30% respectively, in presence of S13 2M were 29 and 55%, and in presence of [Bmim][PF₆] 30% were 74 and 91% respectively.

Immobilization of the enzyme β -Gal-3 on glyoxyl agarose allowed the recovery by centrifugation and reuse of the biocatalyst. Reusing reactions were carried out for the synthesis of Gal- β (1-3)-GlcNAc in three different reaction media: only buffer, adding S13 2M and adding [Bmim][PF₆] 30%. In reuse number 10, the biocatalyst maintained a synthetic activity of 55% in the reaction with only buffer, a 67% with S13, and a 76% with [Bmim][PF₆]. In reuse number 20 the biocatalyst reacting in only buffer and S13 were no longer active, but the enzyme in [Bmim][PF₆] media retained a 62% of activity. In the reuse number 40 among immobilized enzyme reacting in [Bmim][PF₆] media retained a 30% of activity.

The IL [Bmim] [PF₆] 30% used in the reaction with the enzyme β -Gal-3 immobilized on glyoxyl agarose as co-solvent, offered the best yields in the synthesis of disaccharides, allowed more reuses and also, as being not water soluble, could be separated from the reaction media by centrifugation, allowing its reuse and increasing the sustainability of the process.

Chapter 3: Synthesis of glycoconjugates using glycosynthases

Directed mutagenesis of the catalytic residues in the active site of the enzyme β -Gal-3 was developed in order to generate glycosynthase enzyme. The substitution of glutamic-233 (nucleophilic residue) for a glycine resulted in an inactive enzyme. To date, there is no description of any glycosynthase derived from GH35 family, to which β -Gal-3 belongs.

For the next studies, TmGalA D327G glycosynthase from *Thermotoga maritime* was used. Mutagenesis of the enzyme TmGalA and its derivative glycosynthase (TmGalA D327G) were carried out to add a histidine tag to their C-terminal end. His-tag simplified the process of purification and did not affect to their activity, compared with non-tagged versions.

TmGalA D327G enzyme uses Gal- β -N₃ as donor and pNP- α -Glu or pNP- α -Man as acceptors, for the synthesis of the glycoconjugates Gal- α (1-6)-Glu- α -pNP, and Gal- α (1-6)-Man- α -pNP, obtaining a conversion of the substrate of 55 and 57% in each reaction, and yields in the synthesis of glycoconjugates of 35 and 25% respectively. The effect of green solvents on glycosynthase enzymes was evaluated for the first time, using them as co-solvents of TmGalA D327G in the synthesis of the glycoconjugates Gal- α (1-6)-Glu- α -pNP and Gal- α -(1-6)-Man- α -pNF. Solvents derived from biomass proved to be inadequate co-solvents for these enzymes, due to the low conversion rates obtained. However, ILs improved the synthesis results, obtaining the best results with [Troma] [NTf₂], which showed a conversion rate of the starting substrate up to 98 and 97% and a yield in glycoconjugate synthesis of 49 and 80% respectively.

Chapter 4: Functionalization of glycodendrimers using sialyltransferases

Two sialyltransferases, α 2,6SiaT from *Photobacterium leiognathi* and α 2,3SiaT from *Photobacterium phosphoreum*, were used for the functionalization with sialic acid derivatives (Neu5Ac and Neu5Gc) of six glycodendrimers with different multivalency. Neu5Gc was synthesized in a two-step chemo-enzymatic reaction using an aldolase enzyme. To become recognizable substrates for the sialyltransferases enzymes, Neu5Ac and Neu5Gc were activated with CMP using a CMP-sialate synthetase enzyme. α 2,6SiaT was able to complete the reaction with all glycodendrimers, but α 2,3SiaT only generated reaction intermediates. The final yield

of the twelve purified products ranged between 42 and 54% compared with the starting glycodendrimers.

Chapter 5: Structural modification of glycopeptide antibiotics and study of interactions with peptidoglycan precursors by SPR

Structural modifications of glycopeptide antibiotics (Teicoplanin, Mideplanin, Dalbavancin, MDL-63,426 y A-40926) were carried out using glycosidases, lipases, glucose oxidases and serine proteases. None of the tested enzymes showed any positive results, demonstrating the difficulty in finding enzymes which recognize such molecules.

SPR analysis and molecular modelling were developed to study the interaction between glycopeptide antibiotics and peptidoglycan precursors, and also the binding of these molecules to hydrophobic surfaces. We demonstrated for the first time that lipoglycopeptides dimerize like vancomycin-type glycopeptides, not in solution, but when are bound to the peptidoglycan precursor, increasing the stability of the union synergistically. This dimerization implies a new model of action for these antibiotics, according to which, the pharmacological effectiveness of these molecules is directly related to its ability to bind to precursors of bacterial cell wall peptidoglycan, the capability to form dimers on the surface stabilized that union and the anchorage to the cell membrane with lipophilic chains reinforces it.

References

- Alcalde, M., M. Ferrer, F. J. Plou and A. Ballesteros (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." Trends Biotechnol. **24**: 281-287.
- Caines, M. E. C., H. Zhu, M. Vuckovic, L. M. Willis, S. G. Withers, W. W. Wakarchuk and N. C. J. Strynadka (2008). "The Structural Basis for T-antigen Hydrolysis by *Streptococcus pneumoniae*." J. Biol. Chem. **283**(46): 31279-31283.
- Gandolfi, R., S. Jovetic, F. Marinelli and F. Molinari (2007). "Biotransformations of lipoglycopeptides to obtain novel antibiotics." Journal of Antibiotics **60**(4): 265-271.
- Hakomori, S. (2004). "Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization." Glycoconjugate Journal **21**(3): 125-137.
- He, N., D. Yi and W.-D. Fessner (2011). "Flexibility of Substrate Binding of Cytosine-5'-Monophosphate-N-Acetylneuraminate Synthetase (CMP-Sialate Synthetase) from *Neisseria meningitidis*: An Enabling

- Catalyst for the Synthesis of Neo-sialoconjugates." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(13): 2384-2398.
- Hernaiz, M. J., A. R. Alcántara, J. I. García and J. V. Sinisterra (2010). "Applied biotransformations in green solvents." Chemistry - A European Journal **16**: 9422-9437.
- Holeman, A. and P. H. Seeberger (2004). "Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates." Curr. Opin. Biotechnol. **15**(6): 615-622.
- Kamat, S. V., E. J. Beckman and A. J. Russell (1993). "Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluorooform." Journal of the American Chemical Society **115**(19): 8845-8846.
- Khare, D. P., O. Hindsgaul and R. U. Lemieux (1985). "The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-N-biose I and N-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of α -L-fucosyl transferases." Carbohydrate Research **136**(0): 285-308.
- Krishnamurthy, V. M., L. A. Estroff and G. M. Whitesides (2006). Multivalency in Ligand Design. Fragment-based Approaches in Drug Discovery, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 11-53.
- Lemieux, R. U. and H. Driguez (1975). "Chemical synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-D-glucose. Lewis a blood-group antigenic determinant." J. Am. Chem. Soc. **97**(14): 4063-4069.
- Malykh, Y. N., R. Schauer and L. Shaw (2001). "N-Glycolylneuraminic acid in human tumours." Biochimie **83**(7): 623-634.
- Mandal, P. K. and W. B. Turnbull (2010). "Studies on the synthesis of Lewis-y oligosaccharides." Carbohydr. Res. **346**(14): 2113-2120.
- Munoz, E. M., J. Correa, E. Fernandez-Megia and R. Riguera (2009). "Probing the relevance of lectin clustering for the reliable evaluation of multivalent carbohydrate recognition." J Am Chem Soc **131**(49): 17765-17767.
- Nicolaou, K. C., C. N. C. Boddy, S. Bräse and N. Winssinger (1999). "Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics." Angewandte Chemie International Edition **38**(15): 2096-2152.
- Niederer, K. E., D. K. Morrow, J. L. Gettings, M. Irick, A. Krawiecki and J. L. Brewster (2005). "Cypermethrin blocks a mitochondria-dependent apoptotic signal initiated by deficient N-linked glycosylation within the endoplasmic reticulum." Cell. Signal. **17**(2): 177-186.
- Parenti, F., G. Beretta, M. Berti and V. Arioli (1978). "Teichomycins, new antibiotics from Actinoplanes teichomyceticus Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties." J Antibiot **31**(4): 276-283.
- Paulsen, H. (1982). "Advances in Selective Chemical Syntheses of Complex Oligosaccharides." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **21**(3): 155-173.
- Pérez-Sánchez, M., Á. Cortés-Cabrera, H. García-Martín, J. V. Sinisterra, J. I. García and M. J. Hernaiz (2011). "Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol." Tetrahedron **67**(40): 7708-7712.
- Pérez-Sánchez, M., M. Sandoval, A. Cortés-Cabrera, H. García-Marín, J. V. Sinisterra, J. I. García and M. J. Hernaiz (2011). "Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with Biolacta β -galactosidase. ." Green Chem. **13**: 2810-2817.
- Perez-Sanchez, M., M. Sandoval and M. J. Hernaiz (2012). "Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta beta-galactosidase." Tetrahedron **68**(9): 2141-2145.
- Perez, M., J. V. Sinisterra and M. J. Hernaiz (2010). "Hydrolases in Green Solvents." Current Organic Chemistry **14**(20): 2366-2383.
- Perichon, B. and P. Courvalin (2009). "VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4580-4587.
- Perugino, G., A. Trincone, M. Rossi and M. Moracci (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." Trends Biotechnol. **22**(1): 31-37.
- Rapoport, E., S. Khaidukov, O. Baidina, V. Bojenko, E. Moiseeva, G. Pasynina, U. Karsten, N. Nifant'ev, J. LePendu and N. Bovin (2003). "Involvement of the Gal β 1-3GalNac β structure in the recognition of apoptotic bodies by THP-1 cells." Eur. J. Cell. Biol. **82**(6): 295-302.
- Ryu, K. and J. S. Dordick (1992). "How do organic solvents affect peroxidase structure and function?" Biochem. **31**(2588-2598).
- Sandoval, M., A. Cortes, C. Civera, J. Trevino, E. Ferreras, M. Vaultier, J. Berenguer, P. Lozano and M. J. Hernaiz (2012). "Efficient and selective enzymatic synthesis of N-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation." RSC Advances **2**(15): 6306-6314.
- Schmidt, R. R. (1986). "New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides-are there alternatives to the Koenigs-Knorr method " Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**(3): 212-235.
- Schmidt, R. R. and E. Rücker (1980). "Stereoselective glycosidations of uronic acids." Tetrah. Lett. **21**(15): 1421-1424.
- Sheldon, R. A. and F. van Rantwijk (2004). "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." Aust. J. Chem. **57**(4): 281-289.

Abstract

- Shirato, H., S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, Z. Xiaofan, T. Miyamura, T. Wakita, K. Ishii and N. Takeda (2008). "Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding." J. Virol. **82**(21): 10756-10767.
- Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." Science **224**: 1198-1206.
- Takada, A., K. Ohmori, T. Yoneda, K. Tsuyuoka, A. Hasegawa, M. Kiso and R. Kannagi (1993). "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." Cancer Res **53**(2): 354-361.
- Tawaki, S. and A. M. Klibanov (1992). Journal of the American Chemical Society **114**: 1882-1884.
- Wescott, C. R. and A. M. Klibanov (1993). "Solvent variation inverts substrate-specificity of an enzyme." Journal of the American Chemical Society **115**(5): 1629-1631.
- Wilstermann, M. and G. Magnusson (1995). "Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the β -d-Gal p-(1 \rightarrow 3)- β - and - β -d-Gal pNAc groups." Carb. Res. **272**(1): 1-7.
- Yagi, H., M. Yanagisawa, Y. Suzuki, Y. Nakatani, T. Ariga, K. Kato and R. K. Yu (2010). "HNK-1 Epitope-carrying Tenascin-C Spliced Variant Regulates the Proliferation of Mouse Embryonic Neural Stem Cells." J. Biol. Chem. **285**(48): 37293-37301.
- Yanagisawa, M. and R. K. Yu (2009). "N-Glycans modulate the activation of gp130 in mouse embryonic neural precursor cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. **386**(1): 101-104.

Listado de abreviaturas

Ap: Ampicilina

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (American type culture collection)

BSA: Albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)

CMP: Citidin monofosfato

Cn: Cloranfenicol

CSS: CMP-Sialato sintetasa

Ctag: Cola de seis hitidinas en el extremo C-terminal de una proteína

CTP: Citidín trifosfato

DC: dicroísmo circular

DH5a: cepa de *E. coli* DH5a

DMF: *N,N*-dimetilformamida anhidra

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DT: Tubo de deriva (Drift tube)

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

ELSD: Detector de dispersión de luz por evaporación (evaporative light scattering detector)

Fru: D-(+)-fructosa

Fuc: D-(+)-fucosa

Fuc- β -MU: 4-metilumbeliferil- β -D-fucopiranosido

Gal: D-(+)-Galactosa

Gal: D-(+)-galactosa

GalNAc: *N*-acetil-D-galactosamina

GalNH₂: D-(+)-galactosamina

Gal- β -F: 1-desoxi-1-fluoro- α -D-galactopiranosido

Gal- β -N₃: β -D-Galactopiranosil azida

GDP-Man: Guanosin difosfato- α -D-manosa

GlcNAc: *N*-acetil-D-glucosamina

Glu: ácido glutámico

Glu: D-(+)-Glucosa

Glu: D-(+)-glucosa

HisTag: Cola de seis histidinas en uno de los extremos de una proteína

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)

IPTG: Isopropil-b-D-tiogalactopiranosido

K_A: Constante de asociación

K_D: Constante de disociación en el equilibrio

Kn: Kanamicina

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

LI: Líquido iónico

Man: D-(+)-Manosa

Man: D-(+)-manosa

MES: ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico

MeTHF: Metil tetrahidrofurano

MRSA: Estafilococos resistentes a meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

NCBI: Base de datos: Nacional Center for Biotechnology Information

Neu5Ac: Ácido *N*-acetilneuramínico

Neu5Gc: Ácido *N*-glicolilneuramínico

Ntag: Cola de seis histidinas en el extremo *N*-terminal de una proteína

***o*NF:** *o*-nitrofenol

ORF: Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PEG: Polietilenglicol

pET 22b(+): Plásmido comercial PET 22b(+) (Novagen)

pET 24d(+): Plásmido comercial PET 24d(+) (Novagen)

pET 28b(+): Plásmido comercial PET 28b(+) (Novagen, Reino Unido)

Pfu polimerasa: DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus*

pNF: *p*-nitrofenol

pNF- α -Fuc: *p*-nitrofenil- α -D-fucóspiranosido

pNF- α -Gal: *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido

pNF- α -GlcNAc: *p*-nitrofenil- α -N-acetilglucosaminopiranosido

pNF- α -Glu: *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido

pNF- α -Man: *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido

pNF- β -D-Man: *p*-nitrofenil- β -D-manopiranosido

pNF- β -Fuc: *p*-nitrofenil- β -D-fucóspiranosido

pNF- β -Gal: *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

pNF- β -GlcNAc: *p*-nitrofenil- β -N-acetilglucosaminopiranosido

pNF- β -Glu: *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

PPi: Pirofosfato inorgánico

PSA: Persulfato de amonio

psi: Libras por pulgada cuadrada (unidades de presión: *pounds per square inch*)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMSD: raíz media de desviación de los cuadrados (*root mean square deviation*)

SC: Cámara de spray (*Spray Chamber*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS

SOC: Medio de cultivo rico en nutrientes para cultivar bacterias sometidas a electroporación

SPR: Resonancia de plasmón de superficie

STD: Diferencia de transferencia de saturación (*Saturation Transfer Difference*)

TAE: Tampón tris (40 mM) /EDTA disódico (2mM) / ácido acético 0,1142% m/v)

Temed: Tetrametiletilendiamina

TH: Medio de cultivo para *Thermus thermophilus* (preparado con agua milli Q)

TLC: Cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*)

TmGalA: α -galactosidasa de *Thermotoga maritima*

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

Tth polimerasa: DNA polimerasa de *Thermus thermophilus*

UDP-Glu: Uridin difosfato- α -D-glucosa

UI: Unidad enzimática, equivalente a la cantidad de proteína que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto.

UV: Ultravioleta

VOC: Compuesto orgánico volátil (Volatile Organic Compound)

VRE: Enterococos resistentes a vancomicina (Vancomycin-resistant enterococci)

VRSA: Estafilococos resistentes a vancomicina (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)

α 2,3SiaT: α / β -galactosido α -2,3-sialiltransferasa

α 2,6SiaT: β -galactosido α -2,6-sialiltransferasa

β -Gal-3: β -Galactosidasa-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382

I. INTRODUCCIÓN	9
<i>I.1. Importancia biológica de las glicoestructuras</i>	<i>10</i>
I.1.1. Oligosacáridos y glicoconjugados	10
I.1.2. Glicodendrimeros: Modelos multivalentes para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína	15
I.1.3. Glicopéptidos:glicoestructuras con función antibiótica.....	17
I.1.3.1. Mecanismo de acción de los glicopéptidos.....	19
I.1.3.2. Resistencia a antibióticos de tipo glicopéptido	23
<i>I.2. Enzimas útiles en la síntesis de oligosacáridos y glicoestructuras</i>	<i>24</i>
I.2.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas	27
I.2.1.1. β -Galactosidasa β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382.....	31
I.2.1.2. Glicosidasas de <i>Thermus thermophilus</i> PRQ25.....	32
I.2.2. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosintasas	33
I.2.2.1. α -Galactosintasa de <i>Thermotoga maritima</i>	36
I.2.3. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosiltransferasas.....	36
I.2.3.1. Sialiltransferasas: funcionalización de glicoestructuras con ácidos siálicos	39
I.2.4. Enzimas aplicadas a la modificación de regiones no glicosídicas de glicoestructuras.....	40
I.2.4.1. Lipasas	40
I.2.4.2. Serín proteasas	41
I.2.4.3. Glucosa oxidasas.....	41
I.2.5. Procesos de Inmovilización y estabilización de enzimas.....	42
I.2.5.1. Inmovilización covalente por unión a un soporte:	43
I.2.5.2. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas.....	47
<i>I.3. Glicosidasas en disolventes sostenibles</i>	<i>49</i>
I.3.1. Los principios de la química sostenible	50
I.3.2. Disolventes Sostenibles.....	51

I.3.2.1. El agua	52
I.3.2.2. Disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables.....	53
I.3.2.3. Disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental.....	54
I.3.2.4. Disolventes orgánicos fluorados.....	56
I.3.2.5. Líquidos iónicos (LIs).....	57
I.3.3. Galactosidasas en disolventes sostenibles	59
I.3.4. Estudio de la influencia de los disolventes sostenibles en la actividad enzimática	60
I.3.4.1. Espectroscopia de Fluorescencia	61
I.3.4.2. Herramientas de Bioinformática.....	62
I.4. Estudios de interacciones moleculares entre glicoestructuras y ligandos.....	66
I.4.1. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)	66
I.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	69
I.4.2.1. Experimentos de diferencia de la transferencia de saturación (STD)	70
II. OBJETIVOS.....	73
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
III.1. Capítulo 1. Búsqueda de glicosidasas útiles en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico.....	78
III.1.1. Selección de organismos mesófilos productores de glicosidasas	78
III.1.1.1. Selección de microorganismos mesófilos productores de glicosidasas	79
III.1.1.2. Búsqueda de actividad de transglicosidación con células enteras de organismos mesófilos.....	83
III.1.1.3. Inducción de la producción de β -fucosidasa de <i>Cellulomonas gelida</i>	85
III.1.1.4. Purificación de la enzima β -fucosidasa de <i>Cellulomonas gelida</i>	88
III.1.1.5. Búsqueda de actividad de transglicosidación con β -fucosidasa semipurificada de <i>C. gelida</i>	97

III.1.2. Búsqueda de termozimas con actividad glicosidasa y glicosiltransferasa	98
III.1.2.1. Búsqueda de actividades glicosidasa con células enteras de <i>T. thermophilus</i> PRQ25	98
III.1.2.2. Búsqueda de actividades de transglicosidación con células enteras de <i>T. thermophilus</i> PRQ25	99
III.1.2.3. Búsqueda de potenciales glicosidasas y glicosiltransferasas en el genoma <i>T. thermophilus</i> PRQ25	100
III.1.2.4. Amplificación de secuencias de genes de <i>T. thermophilus</i> PRQ25	101
III.1.2.5. Producción de termozimas de <i>T. thermophilus</i> PRQ25	110
III.1.2.6. Caracterización de actividades de termozimas de <i>T. thermophilus</i> PRQ25	114
III.2. Capítulo 2: Síntesis de disacáridos de interés biológico mediante glicosidasas	118
III.2.1. Producción y purificación de la enzimas β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382	118
III.2.2. Estudio de potenciales actividades glicosidasa de las enzimas β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382	122
III.2.2.1. Cálculo de pH óptimo de reacción de β -Gal-3	124
III.2.2.2. Termoestabilidad de β -Gal-3	124
III.2.2.3. Temperatura óptima de reacción de β -Gal-3	125
III.2.3. Síntesis de disacáridos catalizada por la enzima β -Gal-3 DE <i>B. circulans</i> ATCC 31382	126
III.2.3.1. Reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa	131
III.2.3.2. Reacciones de transglicosidación en presencia de líquidos iónicos (LIs)	136
III.2.3.3. Escalado de la producción de disacáridos β (1-3) en presencia de S13 y [Bmim][PF ₆]	142

<i>III.4. Capítulo 4. Funcionalización de glicodendrimeros mediante sialiltransferasas</i>	186
III.4.1. Síntesis de los sialoconjugados Neu5Ac-CMP y Neu5Gc-CMP	188
III.4.1.1. Síntesis químico-enzimática de Neu5Gc	188
III.4.1.2. Activación de ácidos siálicos con CMP	191
III.4.2. Funcionalización de glicodendrimeros con derivados de ácido siálico mediante el uso de enzimas sialiltransferasa	193
III.4.2.1. Reacciones con la enzima $\alpha 2,6$ SiaT de <i>P. leiognathi</i>	195
III.4.2.2. Reacciones con la enzima $\alpha 2,3$ SIAT de <i>P. phosphoreum</i>	196
III.4.2.3. Purificación de sialilglicodendrimeros	197
III.4.2.4. Caracterización estructural de los 2,6-sialoglicodendrimeros	198
Capítulo 5. Modificación estructural de glicopéptidos y estudio de interacciones con precursores de peptidoglicano	211
III.4.3. Modificación enzimática de la estructura de lipoglicopéptidos	213
III.4.3.1. Hidrólisis enzimática de la cadena hidrofóbica de lipoglicopéptidos	213
III.4.3.2. Oxidación enzimática del residuo <i>N</i> -acil-glucosamina de lipoglicopéptidos	214
III.4.3.3. Eliminación enzimática del residuo β -GlcNAc de lipoglicopéptidos	215
III.4.3.4. Eliminación enzimática de residuo α -manosa de lipoglicopéptidos	215
III.4.4. Análisis de interacción glicopéptido-precursor de peptidoglicano mediante SPR	217
III.4.5. Modelado molecular del complejo formado entre glicopéptidos y precursores de peptidoglicano	221
III.4.6. Análisis de interacción de glicopéptidos con superficies hidrofóbicas mediante SPR	224
IV. CONCLUSIONES	227

V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	233
<i>V.1. Materiales.....</i>	<i>234</i>
V.1.1. Reactivos y disolventes	234
V.1.1.1. General	234
V.1.1.2. Electroforesis.....	234
V.1.1.3. Resonancia de Plasmón de Superficie.....	235
V.1.1.4. Disolventes derivados de biomasa	235
V.1.1.5. Líquidos Iónicos (LI)	236
V.1.1.6. Soportes para inmovilización:.....	236
V.1.1.7. Glicodendrimeros	236
V.1.1.8. Glicopéptidos	236
V.1.2. Microorganismos y plásmidos	237
V.1.3. Oligonucleótidos sintéticos	238
V.1.4. Enzimas	239
<i>V.2. Procedimientos generales.....</i>	<i>240</i>
V.2.1. Métodos microbiológicos.....	240
V.2.1.1. Medios de cultivo	240
V.2.1.2. Revitalización y mantenimiento de la colección BTG.....	242
V.2.1.3. Crecimiento de microorganismos.....	243
V.2.1.4. Transformación bacteriana.....	244
V.2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	246
V.2.1.6. Rotura de microorganismos	246
V.2.2. Manipulación de DNA	246
V.2.2.1. Preparación de DNA total	246
V.2.2.2. Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	247
V.2.2.3. Técnicas de amplificación de DNA por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	247
V.2.2.4. Clonaje de genes	247
V.2.2.5. Protocolo Quick-Change para generación de mutantes puntuales.	248

V.2.2.6. Secuenciación de DNA.....	249
V.2.2.7. Electroforesis de en geles de agarosa y purificación de DNA	249
V.2.3. Manipulación de proteínas	249
V.2.3.1. Cuantificación de Proteínas	249
V.2.3.2. Electroforesis de proteínas	251
V.2.3.3. Purificación de β -fucosidasa de <i>C. gelida</i>	252
V.2.3.4. Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad	255
V.2.4. Ensayos enzimáticos.....	257
V.2.4.1. Determinación de la actividad enzimática de glicosidasas.....	257
V.2.4.2. Reacciones de transglicosidación	263
V.2.4.3. Reacciones con glicosiltransferasas	266
V.2.5. Purificación de compuestos	273
V.2.5.1. Extracción del derivado de biomasa S13.....	273
V.2.5.2. Cromatografía en columna de carbono-celite.....	273
V.2.5.3. Cromatografía de intercambio catiónico	274
V.2.5.4. Cromatografía en capa fina (TLC)	274
V.2.5.5. Cromatografía en columna de sílica gel	275
V.2.5.6. Cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-2.....	275
V.2.5.7. Liofilización	275
V.2.6. Inmovilización de la enzima B-Gal-3 de <i>B. circulans</i>	275
V.2.6.1. Inmovilización en polímeros macroporosos.....	275
V.2.6.2. Inmovilización en soporte de glioxil agarosa	278
V.2.7. Tecnicas Analíticas.....	280
V.2.7.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	280
V.2.7.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	283
V.2.7.3. Espectroscopía de Fluorescencia.....	283
V.2.7.4. Resonancia de Plasmón de superficie (SPR).....	284
V.2.8. Herramientas informáticas.....	287
V.2.8.1. Programas bioinformáticos.....	287

V.2.8.2. Modelado molecular y docking de la interacción co-solvente-enzima β -Gal-3	288
V.2.8.3. Modelado molecular y docking de la interacción glicopéptido- precursor de peptidoglicano	291
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	295

I.INTRODUCCIÓN

I.1. Importancia biológica de las glicoestructuras

I.1.1. Oligosacáridos y glicoconjugados

La superficie de las membranas celulares presenta una cubierta de carbohidratos llamada glicocálix, cuya función se creyó durante mucho tiempo que consistía en la protección de la célula contra el medio externo a través de fuerzas de repulsión. Sin embargo, actualmente se sabe que estos oligosacáridos son moléculas que desempeñan un papel muy importante en los procesos de reconocimiento y comunicación celular a través de su interacción específica con diversas proteínas (como las lectinas), actuando como mecanismo de adhesión y señalización celular, generando una respuesta biológica (Lingwood 1998; Schmidt y *col.* 2003; Rudd y *col.* 2004). Así, células, toxinas, bacterias, virus y otros microorganismos interaccionan con receptores de la superficie celular, los cuales en muchos casos son glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas o proteoglicanos, **Figura 1**). Por ello, un gran número de fenómenos biológicos, tales como la inflamación, procesos tumorales, defensa inmune e infecciones víricas y microbianas están mediadas por carbohidratos (Varki 1993; Dwek 1996; Imberty y *col.* 2008).

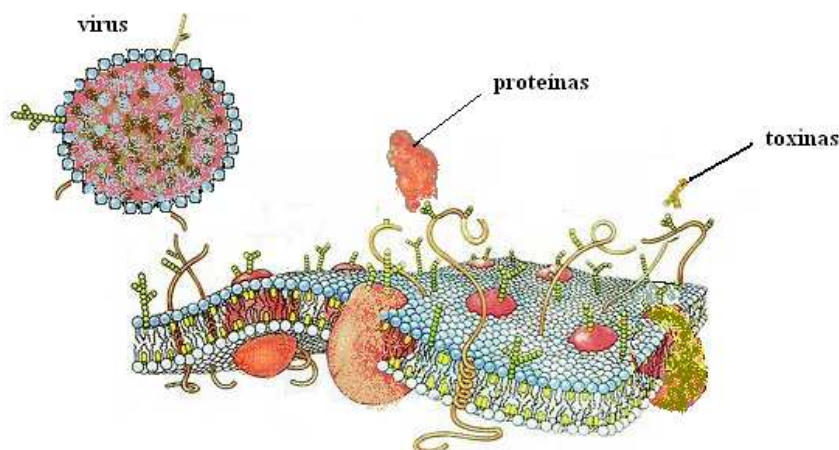


Figura 1. Representación de algunas de las interacciones moleculares que ocurren en la membrana celular donde participan glicoconjugados. (Imagen obtenida de la página <http://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/cnbt>).

Además de su papel como dianas de reconocimiento molecular, los glicoconjugados de la superficie celular pueden ser utilizados como marcadores tumorales. Los llamados antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores (TACA, del inglés Tumor-associated carbohydrate antigens) son el resultado de la glicosilación aberrante causada por los trastornos metabólicos que sufren las células al convertirse en cancerígenas (Heimburg-Molinaro y *col.* 2011). Un ejemplo de gran trascendencia de este tipo de carbohidratos es el antígeno Thomsen-Friedereich, conocido como antígeno T. Está compuesto por la unión $\beta(1-3)$ de una molécula de galactosa con una *N*-acetil- galactosamina (disacárido llamado galacto-*N*-biosa), unida a su vez a una serina o treonina de una mucina de la superficie celular (Gal- $\beta(1-3)$ -GalNAc-Ser/Thr, **(Figura 2A)**). Fue descubierto en 1930 como una curiosidad de laboratorio (Van den Akker y *col.* 1996), sin embargo varias décadas después, ésta molécula y su precursor, el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr, **Figura 2B**), se han asociado de manera inequívoca a tumores (Springer 1984; Holeman y *col.* 2004), llegando a ser expresiones inmunoreactivas del 85% de los carcinomas de pecho, colon, vejiga y próstata, que no aparecen en tejidos sanos (Springer y *col.* 1990; Van den Akker y *col.* 1996). En los últimos años se han desarrollado estrategias antitumorales basadas en la obtención de anticuerpos frente a glicopéptidos sintéticos cubiertos de estos epítomos, alcanzando distintos niveles de éxito (Heimburg-Molinaro y *col.* 2011).

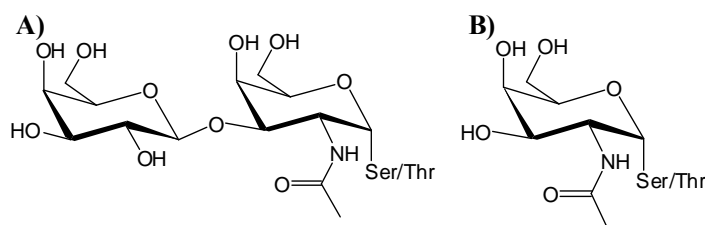
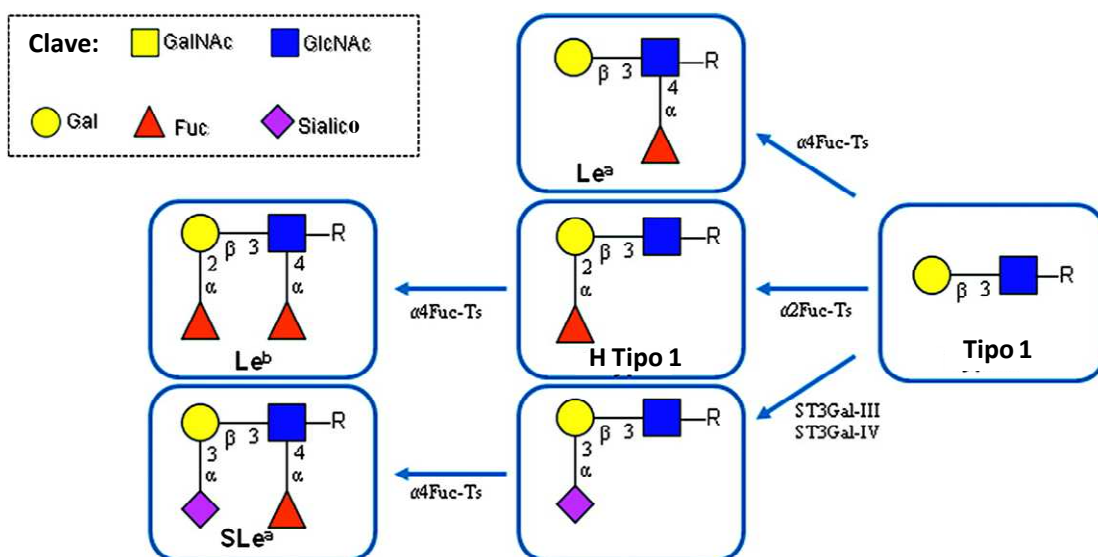


Figura 2. Estructura de algunos disacáridos y glicoconjugados involucrados en procesos de reconocimiento celular: A) Antígeno T; B) Antígeno Tn.

Otro disacárido importante es el formado por la unión $\beta(1-3)$ de galactosa con *N*-acetil-glucosamina (Gal- $\beta(1-3)$ -GlcNAc), disacárido también llamado lacto-*N*-biosa, que compone la base estructural de los antígenos de Lewis de tipo I (**Esquema 1**). En

individuos sanos se expresan sobre todo en fibroblastos y en el lumen de células epiteliales (Hakomori 2001; Ragupathi y *col.* 2009), y participan en los procesos de extravasación (Ravindranath y *col.* 1997). Debido al metabolismo modificado de las células tumorales, se han encontrado en la superficie de células de cáncer de pecho, colon, estómago, páncreas y melanoma (Ravindranath y *col.* 1997; Ugorski y *col.* 2002). La sobreexpresión de estos antígenos favorece la metástasis de las células tumorales, debido a su participación en los ya citados procesos de extravasación (Takada y *col.* 1993). El tratamiento con anticuerpos frente a estos antígenos ha probado ser eficaz para inhibir la metástasis en cáncer de páncreas en ratones, lo que los convierte en interesantes dianas terapéuticas. (Monzavi-Karbassi y *col.* 2001).



Esquema 1. Formación de antígenos de Lewis a partir de Gal-β(1-3)-GlcNAc mediante fucosidación o sialización

La lacto-N-biosa no solo aparece en epítomos de antígenos de la superficie celular, sino que también es un componente fundamental de la lacto-N-tetraosa (Gal-β(1-3)-GlcNAc-β(1-3)-Gal-β(1-4)-Glu), tetrasacárido presente en la leche humana al que se atribuyen cualidades prebióticas e inmunomoduladoras (**Figura 3**) (Murata y *col.* 2006).

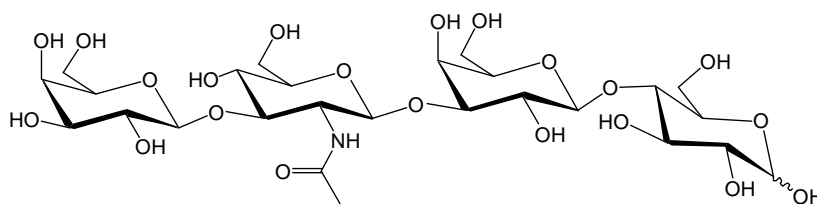


Figura 3. Estructura de la lacto-N-tetraosa (Gal-β(1-3)-GlcNAc-β(1-3)-Gal-β(1-4)-Glu)

Es frecuente encontrar ácidos siálicos en los extremos de los glicoconjugados de las superficies celulares, ya que median en gran cantidad de procesos de interacción azúcar-proteína y están involucrados en los sistemas de reconocimiento y adhesión celular, componentes sanguíneos, inmunología en infecciones, transmisión de impulso nervioso, regulación hormonal y muchos otros (Schauer 1982). Las bacterias, principalmente las patógenas, también producen lipooligosacáridos o polisacáridos en su pared terminados en ácidos siálicos, que imitan a los del individuo hospedador para pasar desapercibidas a su sistema inmune (Chen y *col.* 2010).

Existe gran variedad de ácidos siálicos en vertebrados, pero los más frecuentes son el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc), que se diferencian por un átomo de carbono en su cadena lateral (**Figura 4**) (Chen y *col.* 2010). Una característica que llama la atención es que, a pesar de encontrarse los dos tipos de siálicos en la gran mayoría de células de mamíferos, incluyendo los grandes primates, el Neu5Gc no se encuentra en humanos (Gottschalk 1960). Solo aparece en humanos en células cancerígenas y en las células de los primeros estadios del feto, por lo que se puede utilizar como marcador tumoral (Malykh y *col.* 2001).

Esta divergencia evolutiva se atribuye a un intento de evadir los sistemas de reconocimiento de los patógenos que infectan al hospedador mediante la interacción con Neu5Gc. Es más, diversos autores sitúan el escenario de esta diferenciación en África, cuando la malaria de los grandes primates (malaria NHH, del inglés Non-human hominids) estaba diezmando las poblaciones del continente y los primeros homínidos humanos dejaron de expresar Neu5Gc para solo producir Neu5Ac,

volviéndose inmunes a la infección del parásito *Plasmodium falciparum* (Martin y col. 2005). Posteriormente, el parásito evolucionó a su vez, cambiando sus receptores y siendo capaz de reconocer Ne5Ac, apareciendo un nuevo tipo de malaria que solo afecta a humanos (Rich, Leendertz, y col. 2009). Este es un ejemplo de la “carrera de armamentos” que ha impulsado a la evolución desde el origen de la vida, y en el caso de las interacciones entre patógeno y hospedador, los ácidos siálicos de los glicoconjugados juegan un papel fundamental (Varki 2006).

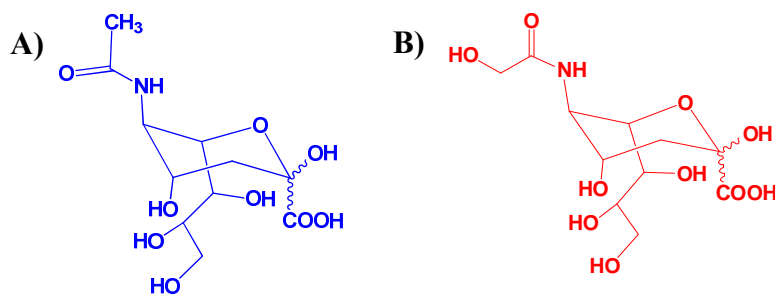


Figura 4. Estructuras de los ácidos siálicos A) Neu5Ac y B) Neu5Gc

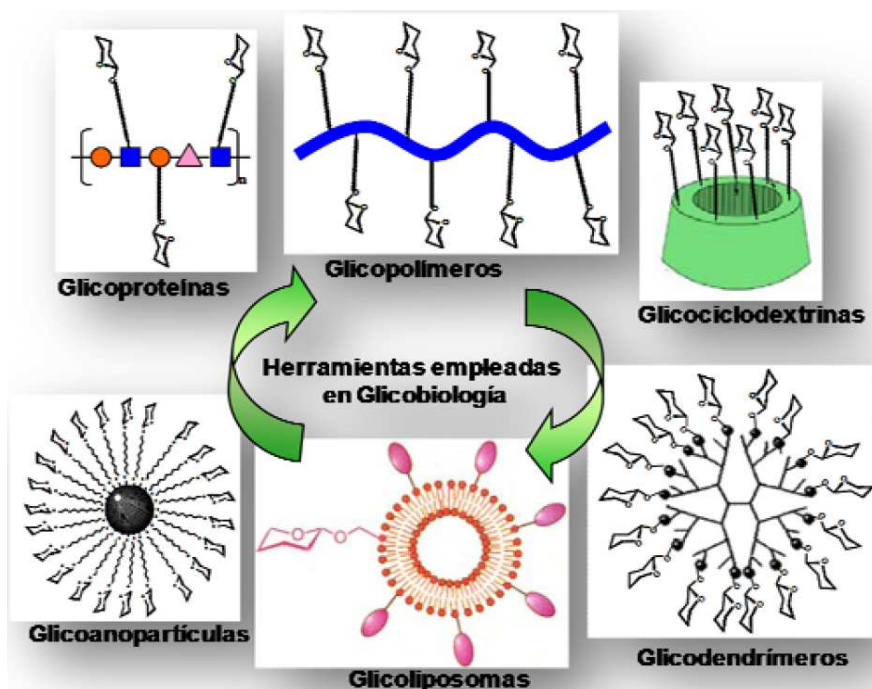
Actualmente, los tratamientos disponibles para muchas de las patologías relacionadas con la interacción y reconocimiento de un patógeno, o bien no son curativos, o presentan problemas debidos a pérdida de eficacia a largo plazo por aparición de resistencias, por lo que son necesario estrategias alternativas para controlar estas patologías (Li y col. 2001; Rubinstein y col. 2001). En este sentido, el desarrollo de inhibidores de los procesos de adhesión en los que están implicadas las interacciones carbohidrato-proteína se ha convertido en un objetivo prioritario para el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos contra los procesos patológicos que median en dichas interacciones (Sears y col. 1998; Yarema y col. 1998; Bertozzi y col. 2001; Rudd y col. 2001; Dube y col. 2005; Bernardi y col. 2008). Para evitar la citada adhesión es necesario entender a nivel molecular las interacciones específicas que tienen lugar entre las moléculas implicadas. No es de extrañar, por tanto, que exista un interés creciente en el estudio de las bases moleculares de los procesos de reconocimiento molecular en los que intervienen los glicoconjugados.

Debido a la complejidad que presenta su aislamiento, purificación y caracterización (Hölemann 2004), el estudio de la implicación de estos epítomos en procesos biológicos se ha desarrollado en menor medida si lo comparamos con el de otras biomoléculas como ácidos nucleicos o proteínas. En los últimos años se ha dado una creciente investigación para obtener glicoconjugados específicos en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios que determinen su verdadera implicación en procesos tumorales o infectivos, así como miméticos que puedan ser utilizados en la lucha contra estas patologías. Este hecho requiere de la exploración de diversas metodologías de síntesis que permitan preparar éstos epítomos, y análogos de estos, en gran cantidad y un alto nivel de pureza, así como el desarrollo de técnicas para medir las interacciones, y han surgido diferentes estrategias para la obtención de sistemas modelo multivalentes que mimeticen los glicoconjugados presentes en las membranas celulares (Schmidt 1986; Mammen 1998; Kiessling 2000; Nicolaou 2001; Houseman 2002; Kiessling 2002; Hölemann 2004).

I.1.2. Glicodendrimeros: Modelos multivalentes para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína

El estudio de los procesos moleculares en los que participan de forma activa los carbohidratos requiere el desarrollo de herramientas que permitan su presentación multivalente. La multivalencia, definida como la interacción múltiple y simultánea entre dos sistemas (agregados moleculares, virus, superficies celulares, etc), supone un gran aumento en la afinidad comparado con la unión de su equivalente monomérico (Krishnamurthy y *col.* 2006). Este aumento sinérgico en la afinidad se denomina efecto “cluster” o dendrítico, y se atribuye a un efecto cooperativo entre los diferentes monómeros que componen el sistema (Ehrlich 1979; Lundquist y *col.* 2000; Turnbull y *col.* 2002). En la bibliografía se encuentran descritos numerosos modelos de sistemas multivalentes con carbohidratos para el estudio de estos procesos biológicos, cuyo diseño está basado en la imitación de los glicoconjugados naturales que están involucrados en dichos procesos (Houseman y *col.* 2002).

Estos sistemas artificiales consisten fundamentalmente en soportes de muy diversa naturaleza, sobre los que se unen varias copias del carbohidrato, originando una presentación multivalente del mismo. La unión del carbohidrato al soporte se establece normalmente a través de un espaciador que proporciona el medio de anclaje, así como una separación suficiente entre el soporte y el ligando, para que el primero no interfiera en la interacción. El diseño y preparación de sistemas multivalentes sintéticos de carbohidrato permite un acceso a una cantidad mayor de compuesto y a un mayor control sobre la estructura, la pureza, la naturaleza del soporte, la multivalencia (número de copias de carbohidratos presentes), etc. Entre los sistemas multivalentes más usados cabe destacar los péptidos y proteínas (Davis 2004), los liposomas (Stewart y col. 1993), los dendrímeros (Röckendorf y col. 2001), los calixarenos (Sanchez-Navarro y col. 2011), las ciclodextrinas (Roy y col. 2000), oligómeros y polímeros (Roy 1996) y las nanopartículas (de La Fuente y col. 2001) (**Esquema 2**).



Esquema 2. Sistemas polivalentes para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína

Uno de los sistemas multivalentes de carbohidratos más utilizados son los glicodendrimeros. Los dendrimeros son macromoléculas altamente ramificadas con estructura casi globular (en función de su tamaño), versátiles, derivatizables y estructuralmente bien definidos (monodispersos) con tamaños y propiedades fisicoquímicas que pueden parecerse mucho a biomoléculas como, por ejemplo, proteínas. Desde su descubrimiento a finales de los años 70 (Buhleier y *col.* 1978), los dendrimeros han demostrado ser unos compuestos con múltiples aplicaciones tanto en ciencia de materiales como en biología y biomedicina (Lee y *col.* 2005). Estos sistemas son muy interesantes para una eficiente presentación multivalente de ligandos biológicos como los carbohidratos (Munoz, Correa, y *col.* 2009). La ventaja de los glicodendrimeros frente a otros sistemas multivalentes con carbohidratos es que se pueden preparar desde compuestos que presentan un número pequeño de unidades de carbohidrato hasta sistemas que presentan un gran número de carbohidratos en la superficie. Es decir, el diseño puede ser ajustado a las características del receptor que se pretende estudiar. Los dendrimeros empleados para la síntesis de estas estructuras son muy diversas, muy utilizados han sido los andamios basados en polialcoholes y en restos aromáticos (Kikkeri y *col.* 2010).

I.1.3. Glicopéptidos:glicoestructuras con función antibiótica

Los glicopéptidos son una clase de antibióticos con acción bactericida producidos por bacterias de tipo actinomiceto. Son glicoestructuras compuestas por un heptapéptido cuyas cadenas laterales se unen formando anillos aromáticos, presentando diferentes residuos como pueden ser átomos de cloro, azúcares o cadenas lipídicas (Nicolaou y *col.* 1999). El primero en ser aislado fue la vancomicina, en el año 1956 (**Figura 5A**) (Eli Lilly). Fue aprobado en 1958 por la FDA y comercializado para fines clínicos. Este antibiótico fue considerado como legendario debido a su acción frente a *Staphylococcus aureus*, y es la última barrera frente a enterococos multi-resistentes y estafilococos resistentes a meticilina (MRSA, de inglés Methicillin-resistant *S. aureus*) (Nagarajan 1994). En el año 1978 se descubrió la teicoplanina (**Figura 5B**), obtenida de la fermentación de *Actinoplanes*

teichomyceticus que presentaba mayor actividad que la vancomicina y que recibió la aprobación para uso clínico en 1988 (Parenti y *col.* 1978). Este fue el primero de los llamados lipoglicopéptidos, que se caracterizan por la presencia de una cadena hidrofóbica en la glucosamina de su anillo D.

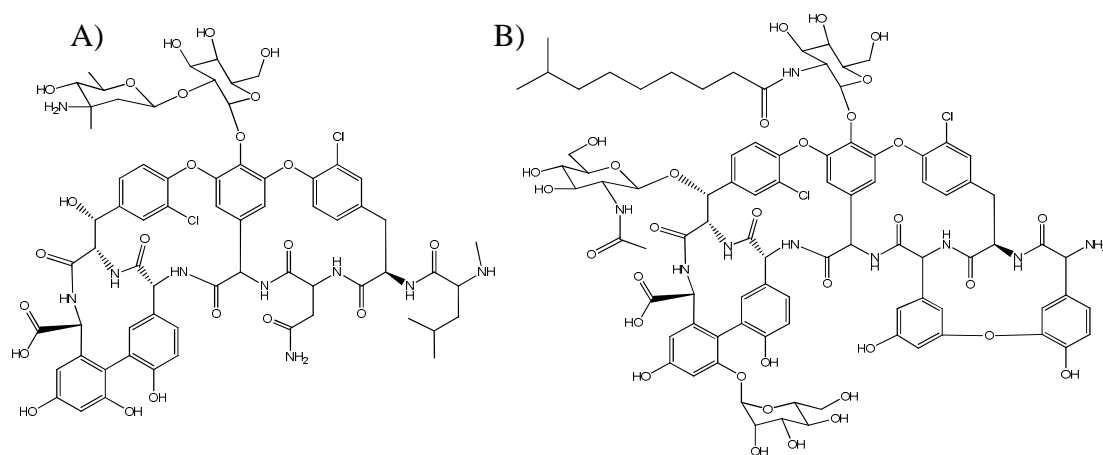
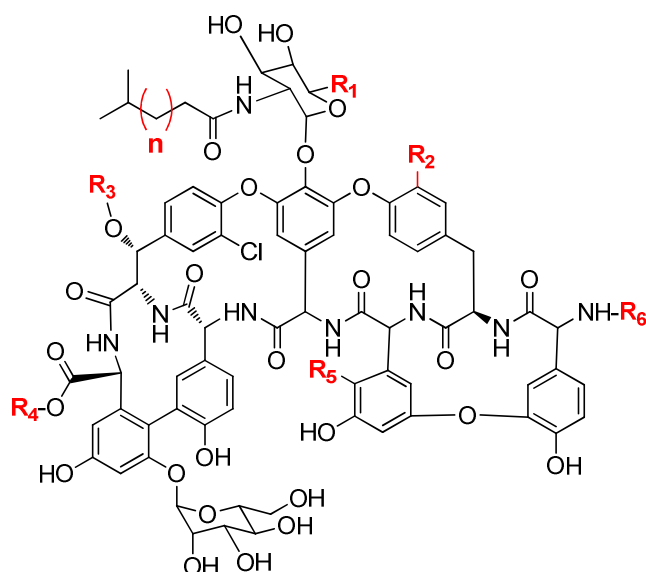


Figura 5. A) Estructura de la vancomicina. **B)** Estructura de la teicoplanina.

Otro lipoglicopéptido natural es el A-40926, producido por *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 (

Esquema 3) (Goldstein y *col.* 1987). Éste y la teicoplanina son la base para obtener los derivados semisintéticos mideplanina, MDL 63,246 y dalbavancina (

Esquema 3), que mostraron resultados prometedores puesto que presentan una actividad mayor, un espectro antibacteriano ampliado y mejores características farmacocinéticas (Biavasco y *col.* 1992; Malabarba y *col.* 2001; Maffioli y *col.* 2005). Mideplanina y dalbavancina se prepararon mediante la amidación química con *N,N*-dimetilamino propilamina desde teicoplanina y A-40926 respectivamente, mientras que MDL 63,246 se obtuvo mediante la reducción del grupo carboxilo del residuo *N*-acilaminoglucurónico desde dalbavancina (Malabarba y *col.* 2001).



	Teicoplanina	Mideplanina	MDL-63,246	Dalbavancina	A-40926
n =	5	5	7	7	7
R₁ =	—CH ₂ -OH	—CH ₂ -OH	—CH ₂ -OH	—COOH	—COOH
R₂ =	—Cl	—Cl	—H	—H	—H
R₃ =			—H	—H	—H
R₄ =	—H	—NH—(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	—NH—(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	—NH—(CH ₂) ₃ —N(CH ₃) ₂	—H
R₅ =	—H	—H	—Cl	—Cl	—Cl
R₆ =	—H	—H	—CH ₃	—CH ₃	—CH ₃

Esquema 3. Estructuras de teicoplanina, mideplanina, MDL, 63,246, dalbavancina y A-40926

I.1.3.1. Mecanismo de acción de los glicopéptidos

Los glicopéptidos actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana mediante la formación de un complejo con el precursor del peptidoglicano UDP-muramil-*N*-acetilpentapeptido. Crean una unión reversible con la porción L-Lys-D-Ala-D-Ala del pentapéptido que impide la reacción de transglicosidación que elonga el

peptidoglicano, lo que resulta en el colapso de éste y la consecuente lisis celular (Nicolaou y *col.* 1999). La unión de los glicopéptidos al L-lys-D-Ala-D-Ala se debe a la formación de cinco puentes de hidrógeno entre ambas estructuras (Figura 6) (Williams y *col.* 1999).

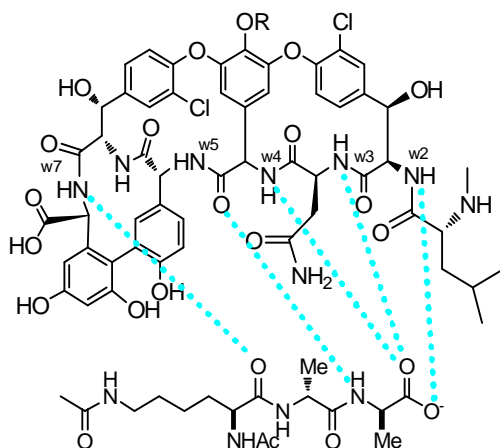


Figura 6 Unión del glicopéptido al L-lys-D-Ala-D-Ala por formación de cinco puentes de hidrógeno entre ambas estructuras

Existen evidencias que indican que la acción de la vancomicina se ve potenciada por la capacidad que tiene este glicopéptido de dimerizar en solución. Según esto, las moléculas se unirían normalmente al L-lys-D-Ala-D-Ala, pero a su vez se uniría también con otra molécula cercana, estabilizando la unión gracias a la redistribución de las cargas de las moléculas y haciendo que los puentes de hidrógeno formados con el L-lys-D-Ala-D-Ala sean más fuertes, siendo éste a la vez un efecto cooperativo y alostérico (**Figura 7A**) (Lahiri y *col.* 1999; Rao, Yan, Lahiri, y *col.* 1999; Rao, Yan, Xu, y *col.* 1999; Cooper y *col.* 2000). Por otro lado, no se ha detectado dimerización en solución en el caso de los lipoglicopéptidos (Mackay, Gerhard, Beauregard, Maplestone, y *col.* 1994). Éstos utilizan su cadena hidrofóbica para anclarse a la membrana celular, lo que aumenta el tiempo de unión al precursor de peptidoglicano (Mackay, Gerhard, Beauregard, Westwell, y *col.* 1994). La teicoplanina es más efectiva que la vancomicina frente a cocos gram positivos (Ravizzola y *col.* 1987; Billeter y *col.* 2008), por ello, la segunda generación de derivados semisintéticos se

ha preparado uniendo residuos hidrofóbicos a la estructura del glicopéptido para potenciar esta capacidad de anclaje a la membrana (Kahne y *col.* 2005; Zhanel y *col.* 2010; James y *col.* 2012).

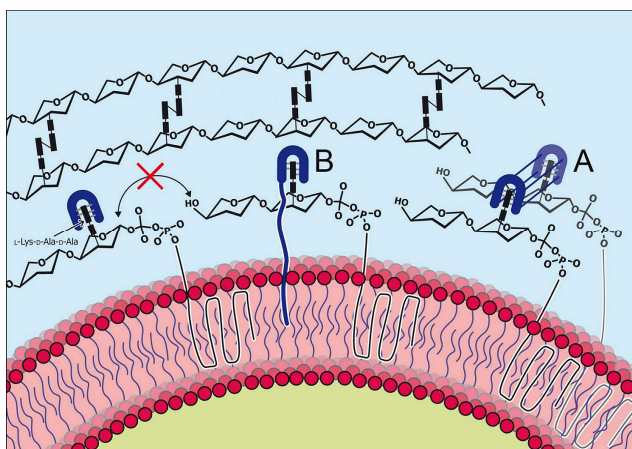


Figura 7. Vista esquemática del mecanismo de acción de los glicopéptidos al unirse a los precursores de peptidoglicano. La vancomicina (A) dimeriza aumentando la actividad antibiótica de ambas moléculas por un efecto cooperativo y alostérico. Los lipoglicopéptidos (B) utilizan su cadena hidrofóbica para anclarse a la membrana plasmática. Imagen obtenida de (Jovetic y *col.* 2010).

En la **Figura 8** se señalan las regiones funcionales de los lipoglicopéptidos, y en el **Esquema 3** los grupos unidos a cada uno de ellos. En la región 1, presentan una cadena hidrofóbica con la doble función de anclar el antibiótico a la membrana celular, lo que aumenta su actividad, y además, aumentar la vida media del mismo, lo que permite la aplicación de la dalbavancina en dosis semanales, a diferencia de la vancomicina, que se debe administrar más frecuentemente (Malabarba y *col.* 2005; Kim, Kuti, y *col.* 2007; Zhanel y *col.* 2008). En la región 2, en el residuo *N*-acil-glucosamina, teicoplanina, mideplanina y MDL 63,246 tienen un alcohol primario en el carbono 6, mientras que A-40926 y dalbavancina tienen ese grupo oxidado a ácido carboxílico. Esta oxidación aumenta la actividad antibiótica del glicopéptido. (Zhanel y *col.* 2008) La región 3 es la causante de la dimerización de dos moléculas de antibiótico. En teicoplanina y mideplanina aparece una molécula de GlcNAc en posición β que no se presenta en el resto. Se considera que la ausencia de esta

molécula puede disminuir la polaridad y mejorar el anclaje a la membrana plasmática, lo que podría aumentar la efectividad frente a cepas resistentes (Kim, Kuti, y *col.* 2007). En la región 4 se localizan los grupos responsables de la formación de los puentes de hidrógeno de unión al precursor de peptidoglicano (Williams y *col.* 1999). En la región 5, mideplanina, MDL 63,246 y dalbavancina presentan una cadena de 3,3-dimetilamino-propilamida, que aumenta la potencia de estos antibióticos, sobre todo frente a estafilococos (Malabarba y *col.* 2005; Kim, Kuti, y *col.* 2007; Zhanel y *col.* 2008). En la región 6 hay un residuo de α -manosa. Se considera que un grupo polar en esta región disminuye la vida media del antibiótico (Zhanel y *col.* 2010).

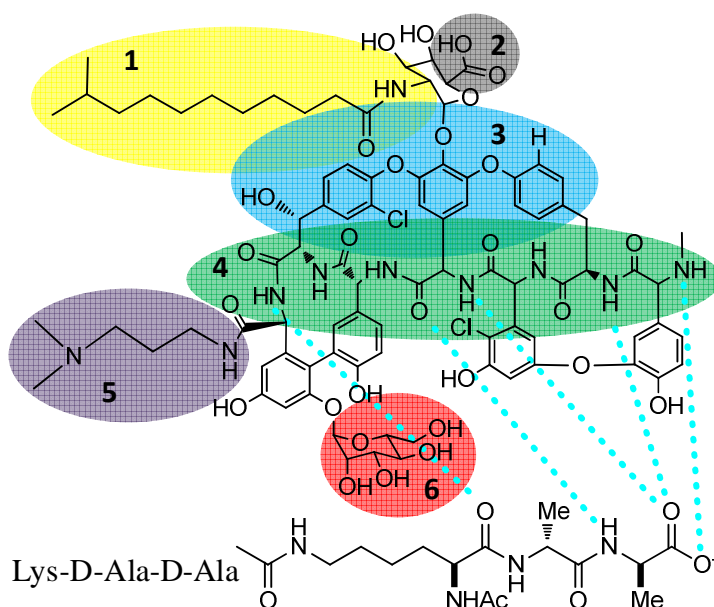


Figura 8. Diferentes regiones funcionales en la estructura de dalbavancina. 1) Cadena hidrofóbica asociada con el anclaje a la membrana celular y la vida media del antibiótico. 2) Grupo que al oxidarse aumenta la actividad del antibiótico. 3) Región responsable de la dimerización de glicopéptidos. 4) Región de unión al precursor de peptidoglicano. 5) Cadena lateral que aumenta la potencia del antibiótico. 6) Azúcar causante de la disminución de la vida media del antibiótico.

I.1.3.2. Resistencia a antibióticos de tipo glicopéptido

En el año 1988 se descubrió por primera vez la existencia de cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE, del inglés vancomycin-resistant enterococci). Estos organismos se pueden dividir en tres categorías: Tipo A, que es resistente a vancomicina y teicoplanina; Tipo B, que es resistente a vancomicina pero sensible a teicoplanina; y Tipo C, que aun siendo sensibles tanto a vancomicina, este antibiótico ve su actividad recucida unas seis veces (Nicolaou y *col.* 1999). Los de tipo A y B basan su resistencia en una modificación en el tripéptido terminal del peptidoglicano, el L-lys-D-Ala-D-Ala, que está sustituido por L-lys-D-Ala-D-Lactato. Este cambio implica la desaparición de uno de los cinco puentes de hidrógeno que se forman entre el antibiótico y el tripéptido por el cambio de un NH por un O, lo que implica una afinidad mil veces menor (**Figura 9**) (Axelsen y *col.* 1998). El tipo C es diferente al tipo A y B, y se basa en el cambio de la alanina terminal del tripéptido por una serina, lo que no evita la formación de los cinco puentes de hidrógeno, pero hace que estos sean más débiles (M. A. van Wageningen y *col.* 1998).

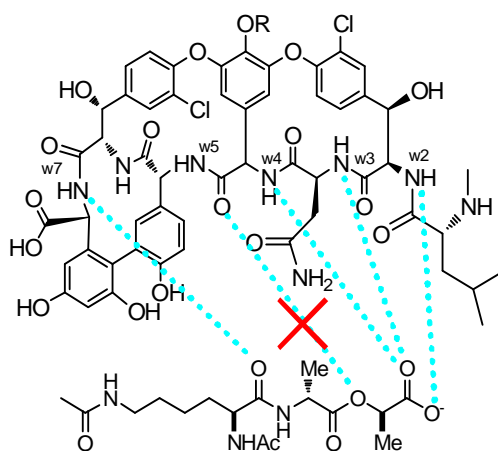


Figura 9. Unión del glicopéptido al L-lys-D-Ala-D-Lactato. El cambio de un NH por un O impide la formación de uno de los puentes de hidrógeno entre ambas moléculas, lo que disminuye mil veces la afinidad comparado con la unión con L-lys-D-Ala-D-Ala.

La base genética de los VRE de tipo A y B se debe a la existencia de un operón con cinco genes plasmídicos: *vanS*, *vanR*, *vanA*, *vanH* y *vanX* (Walsh y *col.* 1996), montados sobre el operón Tn1546 (Perichon y *col.* 2009). Las enzimas VanA, VanH y VanX actúan juntas para llevar a cabo la sustitución de alanina por lactato en el tripéptido, mientras que VanS y VanH se combinan para crear una señal de transducción que activa los genes anteriores (Walsh y *col.* 1996).

En el año 2002 el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, del inglés Center for Disease Control and Prevention) detectó una cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA que había adquirido la resistencia a glicopéptidos (VRSA, del inglés Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) (CDC 2002). Desde entonces se han detectado un total de once cepas VRSA en distintas partes del mundo. Excepto en uno de los casos, de todos los pacientes se aislaron, junto al estafilococo VRSA, también enterococos VRE, lo que implica que los estafilococos pueden adquirir *in vivo* el transposón Tn1546 por conjugación bacteriana (Perichon y *col.* 2009). De ahí la urgencia por encontrar formas de glicopéptidos activos frente a estos organismos. Para ello es necesario modificar la estructura de los antibióticos para conseguir una molécula capaz de unirse a los precursores de peptidoglicano L-lys-D-Ala-D-Lactato de los organismos resistentes (Li, Liu, y *col.* 2012).

I.2. Enzimas útiles en la síntesis de oligosacáridos y glicoestructuras

Los oligosacáridos son el principal tipo de carbohidratos presentes en la naturaleza llegando a tener hasta 10 unidades de monosacárido unidas covalentemente entre sí. Por otra parte los glicoconjugados son moléculas en las que los oligosacáridos están unidos a lípidos o proteínas para dar lugar a glicolípidos o glicoproteínas, respectivamente (Weijers y *col.* 2008). El creciente auge en la química de hidratos de carbono ha buscado la optimización de metodologías para la obtención de

oligosacáridos que pueden reproducir los glicoconjugados presentes en los fenómenos de reconocimiento molecular, así como oligosacáridos ligados a otros fenómenos bioquímicos. Por ello se han utilizado las formas más variadas de obtención de oligosacáridos utilizando: síntesis química (Plante y *col.* 2001; Palmacci y *col.* 2003; Seeberger 2003; Unverzagt 2003; Weiss y *col.* 2003; Seeberger 2008), enzimática (Crout y *col.* 1998; Sasaki y *col.* 2005; Zeng y *col.* 2006; Faijes y *col.* 2007; Hommalai y *col.* 2007; Vocadlo y *col.* 2008; Bojarova y *col.* 2009), o bien una mezcla de ambas (quimioenzimática) (Gambert and Thiem 1997; Gonzalez Lio y *col.* 1999; Koeller 2000; Yan y *col.* 2004; Ueki y *col.* 2010; Yu y *col.* 2010).

La síntesis química de oligosacáridos se caracteriza por varios pasos de protección y desprotección, siendo primordial la correcta activación y protección de la posición anomérica (Bröder y *col.* 1993; Fukase y *col.* 1996; Dasgupta y *col.* 2011). Algunas de las metodologías clásicas para la activación y modificación de carbohidratos fueron las descritas por Koenigs y Knorr (Paulsen 1982), Schmidt (Schmidt y *col.* 1980; Schmidt y *col.* 1986), así como Tietze (Tietze y *col.* 1982). Un aspecto importante a considerar en la síntesis química de oligosacáridos es la regio y estereoselectividad que se requiere para obtener las moléculas de interés específico para cada finalidad, por lo que se requieren numerosos pasos de protección y desprotección lo que obliga a buscar métodos con la menor cantidad de reacciones intermedias para mejorar los rendimientos y disminuir la generación de subproductos y de residuos (Wang y *col.* 2007; Wang 2007; Boltje y *col.* 2009), ya que muchas veces los múltiples pasos en la síntesis de carbohidratos derivan en procesos poco sostenibles y con gran impacto para el medio ambiente.

Otras desventajas que presenta la aproximación química es la gran cantidad de residuos que se genera así como el uso de sustancias contaminantes como parte del medio de reacción, en muchos casos utilizando precursores ó disolventes halogenados (Schmidt y *col.* 1980; Paulsen 1982; Schmidt y *col.* 1986), agentes oxidants fuertes (Böhm y *col.* 1995) o sales de metales pesados con Hg (II) o Ag (I) (Schmidt y *col.* 1980; Paulsen 1982; Böhm y *col.* 1995).

Este hecho, supone claramente una incompatibilidad entre el obtener derivados de carbohidratos por síntesis química y las metodologías sostenibles, pues se contravienen los principios de: prevención, economía atómica, síntesis menos contaminantes (y/o tóxicas), disolventes y auxiliares más seguros y reducción de derivados, todos ellos principios de la química sostenible citados anteriormente (Anastas y *col.* 1998).

Por otra parte, la biocatálisis es una perspectiva muy atractiva para la síntesis de compuestos en condiciones ambientalmente benignas, ya que ofrecen condiciones de reacción moderadas, catalizadores biodegradables y ambientalmente aceptables (normalmente agua), además suelen transcurrir con alta regio-, quimio- y estereoselectividad. A estas ventajas se les suma el hecho de que realizan rutas sintéticas más cortas debido a que no requieren pasos de protección y desprotección por lo que generan menos deshechos (Sheldon y *col.* 2004; Alcalde y *col.* 2006). Todos estos factores, permiten apreciar la síntesis enzimática de oligosacáridos como procesos mucho más sostenibles que los procesos químicos tradicionales. Además se utilizan sustancias menos tóxicas, se disminuye el uso de reactivos auxiliares y muchas veces el disolvente es agua. Por otro lado, dependiendo del tipo de enzima utilizada las condiciones de síntesis se realizan a temperatura y presión ambiente. Todo ello está en clara armonía con varios de los principios de la química sostenible ya discutidos (Anastas y *col.* 1998).

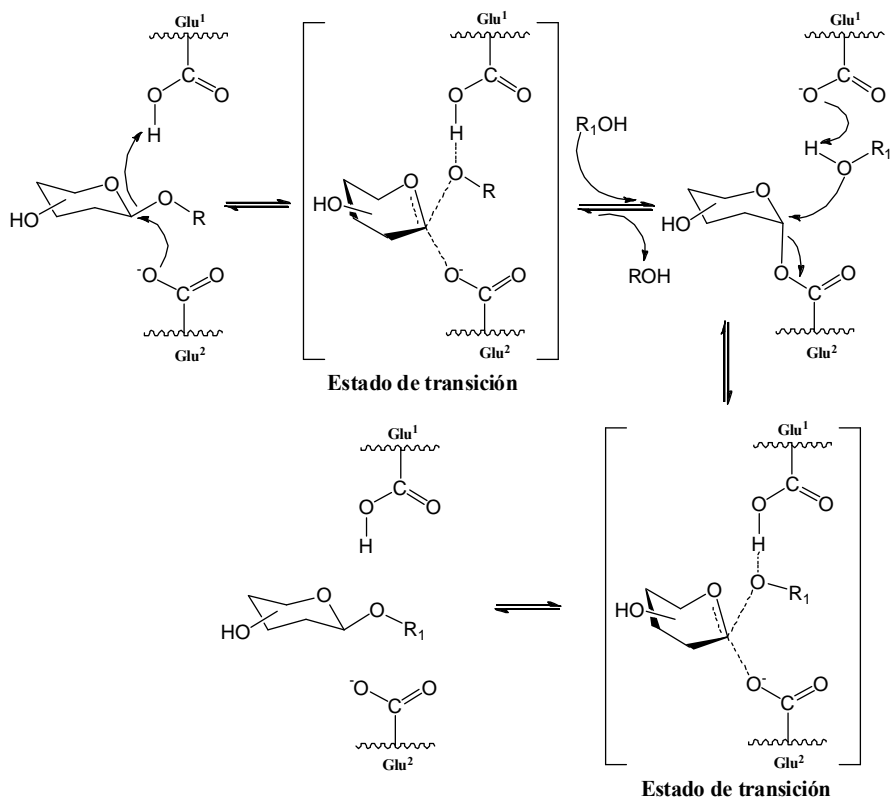
Para llevar a cabo la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados se pueden utilizar principalmente tres tipos de enzimas: 1) glicosidasas (E.C. 3.2.1.); 2) glicosiltransferasas (E.C. 2.4.); 3) glicosintasas (E.C. 3.2.1. glicosidasas) (Perugino y *col.* 2004), éstas últimas son un grupo de enzimas que se han incluido recientemente y que derivan de las glicosidasas.

I.2.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas

Las glicosidasas constituyen una gran familia de enzimas (E.C.3.2.x.y.) que están involucradas en la hidrólisis de enlaces glicosídicos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diferentes organismos, tanto eucariotas como procariotas (Blanchard y *col.* 2001; Vasella y *col.* 2002; Hinou y *col.* 2009).

En los últimos años, el número de las secuencias y estructuras tridimensionales de las glicosidasas ha aumentado enormemente. Por consiguiente la clasificación es complicada y se puede basar en múltiples aspectos como las similitudes de secuencia, la estructura tridimensional, la especificidad de sustrato o el mecanismo de reacción (Henrissat 1997; Vasella y *col.* 2002). Podemos encontrar que las más de 6300 secuencias de glicosidasas se han agrupado en 130 familias basadas en la secuencia aminoacídica. Además, estas familias se agrupan también de un modo diferente, en función de su estructura tridimensional. Así, las encontramos en 14 clanes organizados por orden alfabético desde GH-A hasta GH-N. La importancia fundamental de la clasificación en familias es que debe tener carácter predictivo en cuanto a la especificidad por el sustrato, el mecanismo de acción o la posibilidad de que se formen productos secundarios en la reacción que catalizan (Henrissat 1997).

La mayoría de estas enzimas son exo-glicosidasas, es decir, que hidrolizan únicamente residuos glicosídicos terminales aunque también existen las endo-glicosidasas, que hidrolizan residuos glicosídicos de una cadena oligosacáridica (Giordano y *col.* 2006; Murata y *col.* 2006; Trincone y *col.* 2006). Las glicosidasas, no necesitan la intervención de ningún cofactor y muestran una elevada especificidad por el residuo glicosídico y la naturaleza del enlace glicosídico (Withers y *col.* 1995; Gijzen y *col.* 1996; Koeller y *col.* 2000; Daines y *col.* 2004). En 1995, Withers y Aebersold (Withers y *col.* 1995) propusieron el mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas, que se mantiene vigente hasta hoy (Esquema 4).

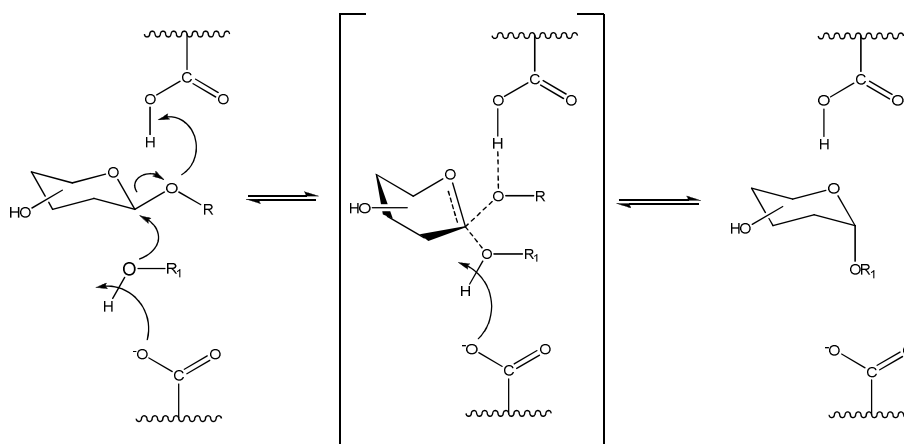


Esquema 4. Mecanismo de reacción en los sitios activos de las glicosidasas con retención de la configuración, propuesto por Withers y Aebersold. (Withers y *col.* 1995)

La función biológica de las glicosidasas es catalizar la hidrólisis de determinados carbohidratos. En el mecanismo de reacción de las glicosidasas (Esquema 4) intervienen dos residuos de ácido glutámico o aspártico, que a efectos prácticos se suelen denominar residuo ácido catalítico (Glu^1) y residuo nucleófilo (Glu^2) (Moracci y *col.* 2001). En un primer paso el Glu^1 protona el oxígeno del carbono anomérico, lo que lo convierte en un buen grupo saliente a uno de los azúcares, mientras que el Glu^2 con carga negativa realiza un ataque sobre el carbono anomérico que posee una carga parcialmente positiva, generando un intermediario enzima-azúcar (Esquema 4) (Withers y *col.* 1995).

En el segundo paso, el complejo azúcar-enzima es atacado por un nucleófilo (R_1OH) que puede ser agua, en este caso la reacción favorecida es la hidrólisis, si el nucleófilo

es un azúcar, la reacción favorecida es la síntesis de un oligosacárido, a esta última reacción se le denomina transglucosidación (Zeng *y col.* 2005; Turner *y col.* 2007; Li, Xiang, *y col.* 2009; Ashida *y col.* 2010). El tamaño y forma del azúcar, así como el origen de la enzima, son determinantes sobre el tipo de enlace generados, α , β , y su dirección, (1-3), (1-4), (1-6), etc. Algunas glicosidasas realizan mecanismos que permiten invertir la configuración sobre el carbono anomérico (Esquema 5). Estas enzimas actúan en un solo paso, mediante el cual uno de los residuos se comporta como ácido y el otro como base, desplazando directamente al grupo saliente ROH. Lo cual se asemeja a un mecanismo de tipo S_N2 (Withers *y col.* 1995).



Esquema 5. Mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas que invierten la configuración propuesto por Whiter y Aebersold (Withers *y col.* 1995).

El mecanismo por el cual las glicosidasas realizan la síntesis de disacáridos requiere condiciones distintas a las condiciones de trabajo en sistemas biológicos, donde la enzima realiza exclusivamente la hidrólisis. Partiendo del mecanismo anteriormente explicado (**Esquema 4**), se pueden entender las estrategias desarrolladas en la síntesis de oligosacáridos con éstas enzimas. La estrategia consiste, en sustituir al agua como nucleófilo, para disminuir la hidrólisis y favorecer la entrada de otras moléculas (azúcares) para sintetizar oligosacáridos. Esta estrategia se logra por aproximaciones termodinámicas y cinéticas, tal y como se muestra a continuación:

1- La aproximación termodinámica: se basa en desplazar un equilibrio químico, favoreciendo la reacción inversa, por ello se le suele conocer como “hidrólisis inversa” o “síntesis por equilibrio controlado” (Perugino y col. 2004), esto implica optimizar condiciones de temperatura, pH, salinidad y principalmente colocar en exceso productos de hidrólisis (v.g. galactosa, que actuarían luego como nucleófilo), y disminuir la presencia de agua, para desfavorecer la hidrólisis. (Vetere y col. 1996; Nieder y col. 2003). Por ello se suelen utilizar mezclas de agua-disolvente, evitando que ésta alcance concentraciones importantes y con ello disminuyendo las posibilidades de que pueda entrar al sitio activo de la enzima y con ello disminuya la hidrólisis.

2- La aproximación cinética: Consiste en usar glicósidos activados que actúan como donadores, éstos se unen con el residuo de ácido glutámico del centro activo de la enzima formando el complejo glicosil enzima antes descrito (**Esquema 4**) y al aumentar la concentración del aceptor, este compite con las moléculas de agua para realizar el ataque nucleofílico sobre el complejo. En estos casos, se suelen utilizar donadores que poseen buenos grupos salientes, por ejemplo glicósidos con fluoruros, azida o *p*-nitrofenil (*p*NF), entre otros. Una vez formado el producto de reacción puede ser hidrolizado por la enzima, pero este hecho dependerá de que la transglicosidación sea más rápida que la hidrólisis y que la hidrólisis del producto de reacción sea más lenta que la del donador (Murata y col. 2003; Sandoval, Ferreras, y col. 2012).

Como ya se ha explicado, entre las glicosidasas hay gran variedad de enzimas, las cuales pueden clasificarse en función del tipo de sustrato que reconocen y según el tipo de enlace que hidrolizan. Dos de los organismos de interés para la búsqueda y caracterización de glicosidasas en el presente trabajo de investigación han sido *Bacillus circulans* ATCC 31382 y *Thermus thermophilus* PRQ25.

1.2.1.1. β -Galactosidasa β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

Bacillus circulans es una bacteria mesófila, Gram positiva, en forma de bastón que habita en el suelo (Bergey y col. 2001). Su cepa ATCC 31382 es capaz de sintetizar tres isoformas de β -galactosidasa, cada una de las cuales es hidroliza un tipo determinado de enlace glicosídico: β (1-3), β (1-4) y β (1-6) (Song y col.). En el año 1997 se clonó por primera vez el gen de la enzima con actividad β (1-3) a la que se denominó β -Gal-3 o β -Gal-C (Ito y col. 1997). Esta enzima, con un tamaño de 67 kD, pertenece a la familia GH35 de las glicosil hidrolasas. No solo hidroliza enlaces de tipo β (1-3), sino que también es capaz de llevar a cabo reacciones de transglicosidación cuando se utiliza como donador *p*NF- β -D-Galactopiranosido (*p*NF- β -Gal) y como aceptores GalNAc y GlcNAc (Fujimoto y col. 1998), y en menor medida Manosa (Man) (Miyasato y col. 2004), para la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc, Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-Man respectivamente.

Como se explicó previamente, los disacáridos β (1-3) presentan un papel fundamental en la estructura de un gran número de glicoconjugados (Springer 1984; Takada y col. 1993; Rapoport y col. 2003; Holeman y col. 2004; Caines y col. 2008; Shirato y col. 2008; Mandal y col. 2010). Su síntesis química se ha llevado a cabo y se ha optimizado para hacerla más eficiente, pero se caracteriza por pasos elaborados de protección y desprotección (Lemieux y col. 1975; Schmidt y col. 1980; Paulsen 1982; Khare y col. 1985; Schmidt 1986; Wilstermann y col. 1995), lo que hace más atractiva la síntesis mediante métodos enzimáticos, a la vez que más sostenible.

Hasta la fecha, se ha utilizado otra glicosidasa para la síntesis por transglicosidación de este tipo de enlaces, la β -galactosidasa de testículos bovinos, pero presenta el inconveniente de que se extrae de un órgano animal, por lo que no es apropiada para su uso a gran escala (Hedbys y col. 1989; Gambert, Lio, y col. 1997; Schroder y col. 2004). Por todo esto, la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* es la candidata ideal para la síntesis enzimática de este tipo de disacáridos.

I.2.1.2. Glicosidasas de *Thermus thermophilus* PRQ25

En las últimas décadas se han descubierto microorganismos capaces de vivir en condiciones que desde una perspectiva humana parecen imposibles, a los cuales se les conoce como extremófilos. Sus condiciones de vida pueden implicar bajas ó altas temperaturas, valores de pH extremos ó altos niveles de sal, siendo el principal requisito para su desarrollo la disponibilidad de agua líquida.(Rothschild y col. 2001) Esta resistencia a ambientes extremos hace de estos organismos, y en especial sus enzimas, biocatalizadores de gran interés industrial.(Niehaus y col. 1999; Sellek y col. 1999; Demirjian y col. 2001; van den Burg 2003; Egorova y col. 2005; Salameh y col. 2007)

Los organismos que poseen una temperatura óptima de crecimiento entre 45°C y 80°C se denominan termófilos y los que superan este valor se denominan hipertermófilos.(Panasik y col. 2000; Vieille y col. 2001; Zhou y col. 2008) La termoestabilidad de éstos organismos se ha intentado explicar en varios estudios, en parte se ha atribuido a la mayor cantidad de interacciones moleculares como por ejemplo: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas,(Li y col. 2005) a la mayor cantidad de cargas eléctricas en la superficie de la proteína, a un aumento en la hidrofobicidad de su núcleo y al reemplazo de aminoácidos considerados como “*termolábiles*” que están expuestos al disolvente.(Paiardini y col. 2002; van den Burg 2003)

Dentro de los organismos termófilos, el género *Thermus*, establecido por Brock y Freeze en 1969,(Brock y col. 1969) es uno de los más extendidos. Incluye cepas termófilas e hipertermófilas que por lo general son aerobias, con una pigmentación amarillo-anaranjada o rojiza.(Yokoyama y col. 1996) La especie *Thermus thermophilus* es una bacteria extremadamente termófila y halotolerante, aislada en Japón y descrita inicialmente como *Flavobacterium thermophilum*.(Oshima y col. 1971) Su cepa PRQ25 fue aislada en la playa de Rebeira Quente, Islas Azores

(Portugal) (da Costa 2001). El genoma de esta cepa ha sido secuenciado y anotado en el laboratorio del Dr. Berenguer, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.(Alvarez y *col.* 2011)

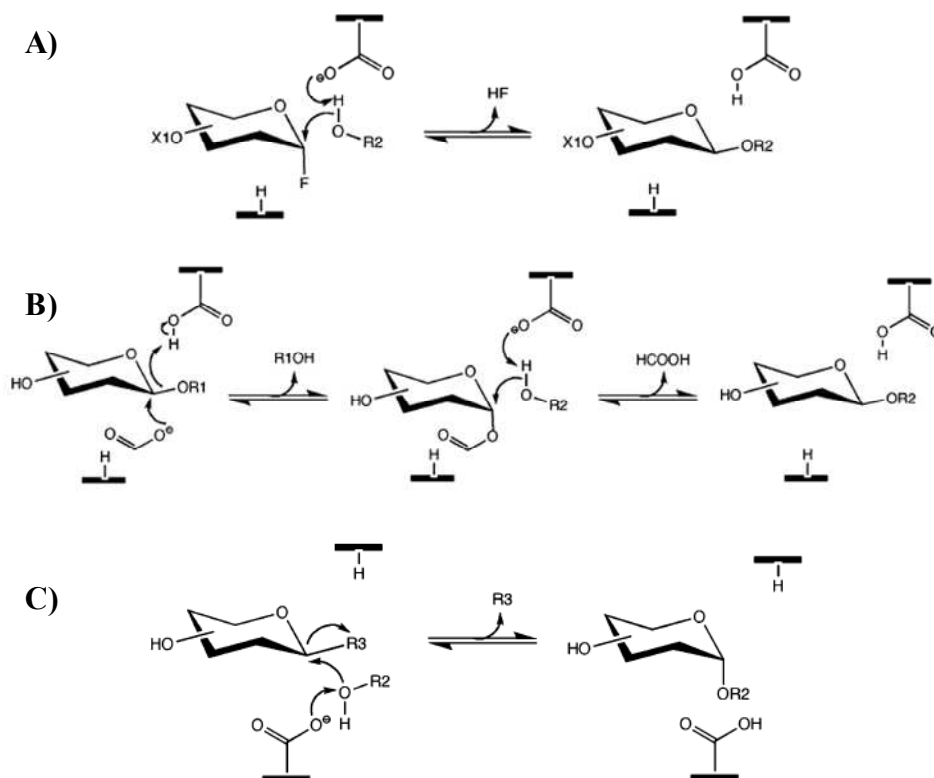
Previamente, se han caracterizado enzimas glicosidasas de otras cepas de *Thermus thermophilus*, como la β -glucosidasa de la cepa HB27, que es capaz de llevar a cabo la reacción de transglicosidación para sintetizar α NF- β -D-Glu-(1-3)- β -D-Glu,(Drone y *col.* 2005) o la β -galactosidasa TTP0042, también de la cepa HB27, que sintetiza Gal- β -D-(1-4)-GlcNAc y Gal- β -D-(1-6)-GlcNAc.(Sandoval, Cortés, y *col.* 2012)

Algunas de las ventajas con las que cuentan las enzimas de organismos termófilos, o termozimas, frente a sus análogas mesófilas son que presentan una mayor resistencia frente a diversos agentes químicos como solventes orgánicos, detergentes y cambios de pH,(Leuschner y *col.* 1995; Sellek y *col.* 1999; Vieille y *col.* 2001) o que tienen una mayor estabilidad y una vida media más prolongada, lo que hace que disminuya la necesidad de sustitución en los procesos y facilita su almacenamiento.(Coolbear y *col.* 1992)

I.2.2. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosintasas

Las glicosintasas surgieron como una evolución de las reacciones de transglicosidación con glicosidasas, con el objetivo de mejorar los limitados rendimientos obtenidos con estas enzimas y por lo tanto, obtener un método eficiente para la síntesis de oligosacáridos (Cobucci-Ponzano y *col.* 2012). Son enzimas derivadas de glicosidasas en las que el centro activo ha sido mutado para reemplazar el residuo nucleófilo por otro no nucleofílico, y son capaces de llevar a cabo la reacción de transglicosidación en presencia de donadores activados con un buen grupo saliente en su carbono anomérico. Debido a la desaparición del residuo nucleófilo, los productos sintetizados por estos mutantes no pueden ser posteriormente hidrolizados, además de no ser necesaria la utilización de una gran concentración de aceptor para que se produzca la síntesis (Mackenzie y *col.* 1998).

Existen fundamentalmente dos mecanismos de acción en la glicosintasas, de inversión y de retención de configuración, en base a la configuración anomérica del sustrato donador y de los productos (**Esquema 6**) (Cobucci-Ponzano y col. 2012).



Esquema 6. A) Mecanismo de una β -glicosintasa con inversión de la configuración. B) Mecanismo de una β -glicosintasa con retención de configuración. C) Mecanismo de una α -glicosintasa.

Las primeras glicosintasas fueron publicadas casi paralelamente, en el año 1998 y provienen de β -glicosidasas con retención de la configuración. Al obtener enzimas glicosintasa, esta configuración se invierte, por lo que el mecanismo propuesto para ellas se basa en la utilización de α -glicósidos activados con fluor para mimetizar el intermedio de reacción típico de reacciones con glicosidasas no mutantes y obtener productos en β (**Esquema 6A**). La primera, de tipo exo-glicosintasa, se obtuvo de la mutación de la enzima β -glucosidasa de *Agrobacterium* sp., en la que se substituyó el

glutámico 358 (residuo nucleófilo) por una alanina y sintetizaba oligosacáridos con un rendimiento superior al 80% (Mackenzie y col. 1998). La otra, de tipo endoglicosintasa, se obtuvo de la mutación del glutámico 134 por alanina de la enzima 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (Malet y col. 1998).

Las glicosintasas con retención de la configuración sintetizan oligosacáridos que mantienen la misma configuración que los azúcares activados utilizados como sustratos donadores (generalmente *p*NF- o 2,4-dinitrofenil-glucósidos). Esta reacción transcurre en presencia de iones externos, como puede ser el formiato de sodio, que se comportan como nucleófilo externo, mimetizando el comportamiento del residuo ácido catalítico del centro activo de la enzima nativa, lo que posibilita la formación de un glicosil-formiato estable y posterior reacción de transglicosidación con el aceptor (**Esquema 6B**). Los productos mantienen la misma configuración que el donador y no pueden ser hidrolizados, a pesar de la presencia del formiato, porque no poseen un buen grupo saliente, lo que permite que se acumulen en la mezcla de reacción con rendimientos cuantitativos. La primera de estas enzimas se produjo en el año 2000, a partir de la mutación del glutámico 387 por una glicina de la enzima LacS de *Sulfolobus solfataricus* (Moracci y col. 1998).

La primera glicosintasa derivada de una glicosidasa con inversión de la configuración fue descrita en 2006 y proviene de la exo-oligoxilanasas de *Bacillus halodurans*, enzima también conocida como Rex (Honda y col. 2006). En este tipo de glicosintasas se sustituye el residuo que actúa como base por un residuo no catalítico, de forma que adquiere el mecanismo de las glicosintasas con inversión de configuración (**Esquema 6A**). En el caso de la Rex, se sustituyó el aspártico 263 por una cisteína.

Desde la invención de las glicosintasas, se han descrito enzimas de este tipo derivadas de 17 familias de glicosidasas de las 130 existentes. De estas, la mayor parte corresponden con enzimas capaces de sintetizar enlaces β -*O*-glucosídicos entre

una gran variedad de sustratos, mientras que las α -glicosintasas (**Esquema 6C**) están limitadas a la familia GH31 (α -glucosintasa), GH29 y GH95 (α -fucosintasa), GH36 (α -galactosintasa) (Cobucci-Ponzano y *col.* 2012). Esta última se trata de la α -galactosintasa de *Thermotoga maritima*, una de las enzimas utilizadas en este trabajo de investigación (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011).

I.2.2.1. α -Galactosintasa de *Thermotoga maritima*

T. maritima es una bacteria termófila Gram negativa con forma de bastón, aislada en 1986 de sedimentos marinos calentados por actividad geotérmica. Es capaz de crecer entre 60 y 90 °C, presentando su óptimo de crecimiento a 80 °C (Huber y *col.* 1986). Produce una enzima α -galactosintasa que pertenece a la familia GH36, la TmGalA, capaz de hidrolizar los residuos de galactosa en posición $\alpha(1-6)$ (Miller y *col.* 2001). Ésta enzima no es capaz de llevar a cabo la reacción de transglicosidación para sintetizar oligosacáridos, pero ese problema se solucionó gracias a la obtención de su glicosintasa, que se obtuvo de la mutación del centro activo de TmGalA, cambiando el aspártico 327 por glicina. Esta galactosintasa es capaz de sintetizar disacáridos cuando se utiliza galactosa con un grupo azida en posición β como donador (Gal- β -N₃) y pNF- α -Glu y pNF- α -Man como aceptores (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011).

I.2.3. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosiltransferasas

Las glicosil transferasas son biocatalizadores responsables de la síntesis de oligosacáridos *in vivo*, incluidas en el grupo E.C. 2.4, de clasificación de enzimas (Shur 1993). Al igual que en el caso de las glicosidasas, se ha intentado establecer una clasificación de estas enzimas en 91 familias basadas en la similitud de la secuencia aminoacídica propuesta por Campbell y *col.* (Campbell y *col.* 1997).

Las glicosil transferasas presentan una elevada especificidad frente al tipo de sustrato y a la naturaleza del enlace glicosídico que se forma. Como consecuencia, estas enzimas se han empleado en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados con una gran eficacia y alta especificidad. Existen múltiples ejemplos en los que han sido utilizados con éxito: la síntesis de tetrasacáridos ramificados (Niggemann 1998), derivados de antígenos sialil Lewis (Elling 1999), y diferentes oligosacáridos (Hirschbein 1982; Wong 1982; Dudziak 1998; Hoh 2002; Michalik 2002) o glicopéptidos (Gutiérrez Gallego 2003).

Como ya se ha comentado, las glicosiltransferasas presentan en su estructura un sitio de reconocimiento específico del aceptor. Un claro ejemplo es la β -(1-4)-galactosiltransferasa de leche bovina, cuyo aceptor natural es GlcNAc, preferentemente sus β -derivados. Los β -glucósidos también son aceptados, aunque en el caso de los α -glucósidos, se necesita la presencia de lactalbúmina para que la reacción tenga lugar (Wong 1991). También se ha descrito la utilización de aceptores hidrofóbicos que incorporan en sus estructuras cadenas alifáticas de 8 átomos de carbono (C_8) para llevar a cabo ensayos de la actividad enzimática de las glicosiltransferasas (Palcic 1988).

Por otro lado, las glicosiltransferasas han sido utilizadas para llevar a cabo la síntesis de glicopéptidos. En estos casos, se ha descrito que la presencia de grupos sulfato en los residuos de Tyr de la cadena peptídica, provocan una disminución de la actividad tanto de la galactosil- como de la sialiltransferasa a la de hora de incorporar los respectivos donadores a la estructura (Koeller 2000).

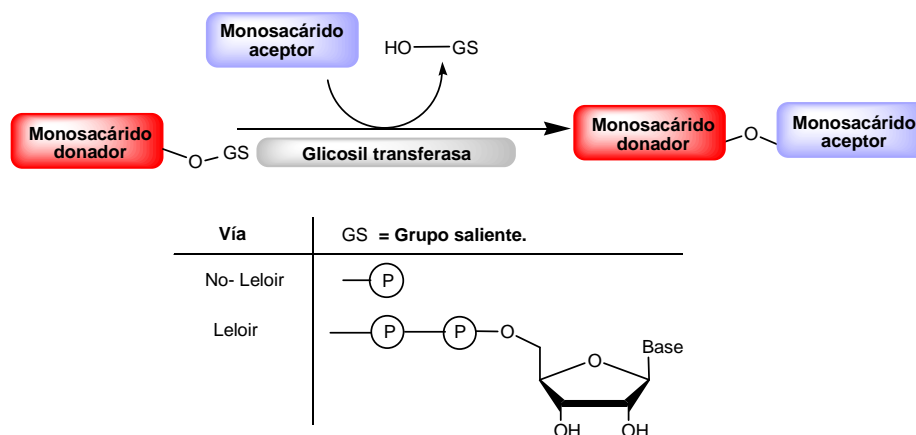
La principal desventaja del uso de las glicosiltransferasas es la poca disponibilidad comercial y el alto coste tanto de los sustratos donadores como de las propias enzimas. Por ello, en los últimos años se buscan nuevas fuentes de obtención de glicosiltransferasas con diferente regioselectividad, y mejores características cinéticas y de estabilidad para poder aumentar la versatilidad de estas enzimas en la

síntesis de oligosacáridos. De este modo, han aparecido diferentes ejemplos, como la $\beta(1-3)$ -galactosiltransferasa aislada del tejido conectivo de caracol *Lymnaea stagnalis* (Mulder 1991), o la α -glucosiltransferasa de *Talaromyces duponti* para aplicación en la síntesis de alquil-glucósidos (Bousquet 1998).

Para solventar el problema de la disponibilidad de los sustratos se han descrito estrategias en las que se regenera el donador mediante otro sistema enzimático, o también se estudian posibles nuevos donadores más accesibles que los clásicos activados mediante nucleótidos (Wong 1982; Palcic 1991; Srivastava 1993; Breton 1999). Por otro lado, el problema de la disponibilidad de las enzimas es más difícil de solucionar debido a su inestabilidad y la complejidad de su aislamiento. En este sentido están apareciendo estudios que emplean la ingeniería genética como herramienta para mejorar la disponibilidad de estas enzimas o incluso llevar a cabo este tipo de transformaciones con células enteras (Herrmann 1995; Baisch 1998).

Aunque en general hay muy pocos motivos conservados, a excepción de la familia de las sialiltransferasas, sí que se presentan pequeños residuos muy conservados que tienen una relación muy estrecha con su implicación biológica (Breton 1999). Muchas han sido las estructuras cristalizadas en los últimos años, y pese a las diferencias estructurales que se presentan, en todas ellas se revela un sitio de reconocimiento del aceptor, lo que indicaría su especificidad de sustrato (Ramakrishnan 2002).

En cuanto al mecanismo de acción de estas enzimas, cabe destacar que el residuo donador que se va a unir a la cadena de oligosacárido está activado por fosforilación en la posición anomérica. Se han descrito 2 vías de acción de estas enzimas según la activación de la posición anomérica. En primer lugar, se llama vía Leloir a aquella en la que el grupo activante del hidrato de carbono donador es un nucleótido. Por el contrario, si este grupo activante es un fosfato, la vía de acción de estas enzimas es la vía no-Leloir (Esquema 7) (Niggemann 1998).



Esquema 7. Vías de acción de las glicosil transferasas. Diferentes grupos activantes del monosacárido donador (Faber 2004).

I.2.3.1. Sialiltransferasas: funcionalización de glicoestructuras con ácidos siálicos

Debido a la dificultad de la sialización química, se suelen utilizar métodos enzimáticos para llevar a cabo este tipo de reacciones (Chen y *col.* 2010). Las sialiltransferasas catalizan la transferencia de un ácido siálico activado con citidin monofosfato (CMP) a un azúcar aceptor por la vía Leloir. Este tipo de enzimas aparecen en bacterias patógenas, aunque no suelen presentar problemas de producción o de plegamiento a clonaras en *E. coli* (Takakura y *col.* 2007), por lo que se han convertido en herramientas eficientes para la síntesis de glicoconjugados sializados. Hasta la fecha, se han encontrado sialiltransferasas en *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus* sp., *Neisseria* sp., *Photobacterium* sp., y *Vibrio* sp., y se han clasificado en las familias GT42, GT52 y GT80 respectivamente. Se clasifican principalmente en α/β -galactosido α -2,3-sialiltransferasas (2,3SiaT, E.C. 2.4.99.4) y β -galactosido α -2,6-sialiltransferasas (α 2,6SiaT, E.C. 2.4.99.1), de las cuales, las α 2,3SiaT pueden transferir los CMP-sialicos tanto a α como β -galactósidos, pero las α 2,6SiaT solo aceptan β -galactósidos. Entre los galactósidos aceptores de estas enzimas, destacan residuos de lactosa y lactosamina o antígenos como los de Lewis, T o Tn (Li and Chen 2012).

De entre las sialiltransferasas bacterianas, las $\alpha 2,6$ SiaT y $\alpha 2,3$ SiaT de *Photobacterium* sp. presentan un pH óptimo de 8, a diferencia del pH 6 o 6,5 de otras sialiltransferasas. Un pH óptimo alcalino es más apropiado para la síntesis de sialilconjugados, ya que los CMP-siálicos no son estables en condiciones ácidas (Yamamoto y col. 2007). Además, estas enzimas han sido utilizadas con éxito para la síntesis de sialilconjugados naturales y no naturales (Yu y col. 2006; Muthana y col. 2009; Cheng y col. 2010). Por estos motivos, estas enzimas serán las utilizadas en este trabajo para la funcionalización de glicodenrímeros con ácidos siálicos.

I.2.4. Enzimas aplicadas a la modificación de regiones no glicosídicas de glicoestructuras

Dada la complejidad de las glicoestructuras, existen enzimas útiles para la modificación de residuos no glicosídicos que pueden alterar la función de éstas. Las lipasas, serin proteasas y glucosa oxidasas son enzimas de interés en este trabajo de investigación para la modificación de antibióticos de tipo glicopéptido.

I.2.4.1. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres carboxílicos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se pueden encontrar en: animales, plantas, hongos y bacterias (Schmid y col. 1998; Fojan y col. 2000). Se caracterizan por su alta regioselectividad y estereoselectividad (Bornscheuer y col. 1999; Liese y col. 2000; Schmidt y col. 2005). Una de las principales características de las lipasas es su promiscuidad catalítica, definida como la capacidad que poseen las enzimas de catalizar reacciones que se diferencian de su reacción fisiológica natural (Hult y col. 2007; Gupta y col. 2011; Kapoor y col. 2012). Dada esta característica, se han logrado realizar numerosas reacciones catalizadas por distintas lipasas en las que se obtienen productos con enlaces distintos a ésteres (Kapoor y col. 2012), tales como: la síntesis de amidas (Gotor-Fernández y col. 2006), reacción de Mannich (Li, He, y col. 2009; He y col. 2010)

adiciones aldólicas (Li y col. 2008) y formación de enlaces carbono-carbono entre otras (Branneby y col. 2003; Svedendahl y col. 2005), por lo que pueden ser útiles para la modificación de glicoestructuras.

I.2.4.2. Serín proteasas

Las serín proteasas son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de proteínas y péptidos que poseen en su centro activo un aminoácido de serina, esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas (clasificadas como EC 3.4.21) incluye a la tripsina, quimotripsina, subtilisina y otras (Hedstrom 2002). Las subtilisinas son enzimas bien caracterizadas tanto física como químicamente, que tienen un peso molecular entre 20-45 KDa. Son secretadas en grandes cantidades por muchas especies del género *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens* o *B. subtilis*, del que reciben el nombre (Mathews y col. 2003). Al igual que las lipasas, las subtilisinas presentan una baja especificidad de sustrato, lo que permite su utilización para hidrolizar todo tipo de enlaces peptídicos. Se han utilizado en procesado de alimentos y como aditivo en detergentes, además de la industria química y farmacéutica (Rao y col. 1998; Gupta R Fau - Beg y col. 2002). Dada su versatilidad para reconocer diferentes sustratos, pueden ser aplicadas para la modificación de glicoestructuras.

I.2.4.3. Glucosa oxidasas

La glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4) es una enzima de tipo óxidoreductasa que utiliza oxígeno como aceptor de electrones externo para oxidar uno de los grupos hidroxilo de β -D-glucosa, liberando peróxido de hidrógeno. Es una enzima homodimérica que presenta una molécula de FAD unida de forma no covalente en el centro activo de cada subunidad (de 80 kD), por lo que no necesita la presencia de cofactor (Ferri y col. 2011). Fue originalmente aislada del hongo *Aspergillus niger* (Keilin y col. 1948), y sigue siendo a día de hoy la fuente principal de esta enzima. Se utiliza en biotecnología como biosensor para detectar la concentración de glucosa, y como conservante en alimentos por sus características oxidantes (Clark y col. 1962; Bankar

y *col.* 2009). Debido a que el peróxido de hidrógeno producido en la reacción inhibe la actividad de la glucosa oxidasa, se suele acoplar una segunda enzima, como puede ser la catalasa, para descomponerlo y permitir que la reacción finalice (Uppoor y *col.* 1996).

I.2.5. Procesos de Inmovilización y estabilización de enzimas

La inmovilización es una técnica que confina a una enzima catalíticamente activa dentro de un sistema de reacción, dando lugar a un derivado insoluble que posteriormente puede ser reutilizado (Klibanov 1983; Norde y *col.* 1986; Lamb y *col.* 2000). Dentro de las características ventajosas de este tipo de biocatalizadores se puede mencionar que: se mejora la estabilidad de la enzima, permite reutilización del biocatalizador (incluso de forma continua), el catalizador se puede separar con facilidad de la mezcla, se previene la contaminación por proteínas en el producto final y se evitan fácilmente contaminaciones microbianas en el sistema (Bornscheuer 2003).

La inmovilización supone ventajas en términos económicos para las industrias que utilizan biocatalizadores, ya que la posibilidad de reutilizar una enzima hace que la productividad del catalizador (definida como kg de producto obtenidos por kg de catalizador) sea más alta y con ello reduce los costes de manufactura, siendo un ejemplo de ello la producción de ácido 6-aminopenicilánico, cuya productividad es de 600 kg por kg de enzima (Spieß y *col.* 1999; Tischer y *col.* 1999; Sheldon 2007). Por lo anterior, si desde una perspectiva de la química sostenible, el uso de biocatalizadores es considerado como ambientalmente amigable (Sheldon y *col.* 2004; Alcalde y *col.* 2006), el uso de enzimas inmovilizadas puede resultar aún más sostenible, dada la posibilidad de reutilizar el biocatalizador.

El Prof. Sheldon (Sheldon 2007) clasifica las metodologías de inmovilización de enzimas en tres grandes grupos: I) inmovilización covalente sobre un soporte previamente funcionalizado, II) captura de la enzima en matrices orgánicas o

inorgánicas (encapsulamiento) y III) entrecruzamiento de proteínas. En el presente trabajo se han empleado la primera: la inmovilización covalente sobre soportes funcionalizados, que se describe con más detalle a continuación.

I.2.5.1. Inmovilización covalente por unión a un soporte:

La inmovilización covalente sobre un soporte es un proceso en el que la enzima se une a un material con el que forma un derivado estable. Los soportes pueden provenir de fuentes naturales como el quitosano (Barbara 2004; Chiou y *col.* 2004; Taqieddin y *col.* 2004; Cetinus y *col.* 2007; Pan y *col.* 2009), polímeros naturales químicamente modificados como glioxil agarosas (Guisán 1988; Mateo y *col.* 2006; Mateo y *col.* 2010), soportes orgánicos funcionalizados (Mateo, Fernández-Lorente, y *col.* 2000; Boller y *col.* 2002; Mateo y *col.* 2002; Pessela y *col.* 2003; Torres y *col.* 2003; Lu y *col.* 2009) o inorgánicos como la sílica mesoporosa (Fan y *col.* 2003; Wang y *col.* 2005).

El proceso se puede realizar de distintas maneras: adsorción física por atrapamiento en cavidades polares (Luckarift y *col.* 2004; Salis y *col.* 2005), adsorción por fuerzas de Van der Waals (Petkar y *col.* 2006), adsorción por fuerzas iónicas (Mateo, Abian, y *col.* 2000), acomplejamiento metálico (Akgöl y *col.* 2004; Akkaya y *col.* 2007) ó por unión covalente (Mateo y *col.* 2002). De éstos, la unión covalente es una opción muy utilizada debido a la ventaja de que la unión enzima-soporte es irreversible. Para el presente trabajo se han elegido soportes orgánicos funcionalizados con superficies macroporosas y glioxil agarosas como soportes para inmovilizar enzimas de interés en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados.

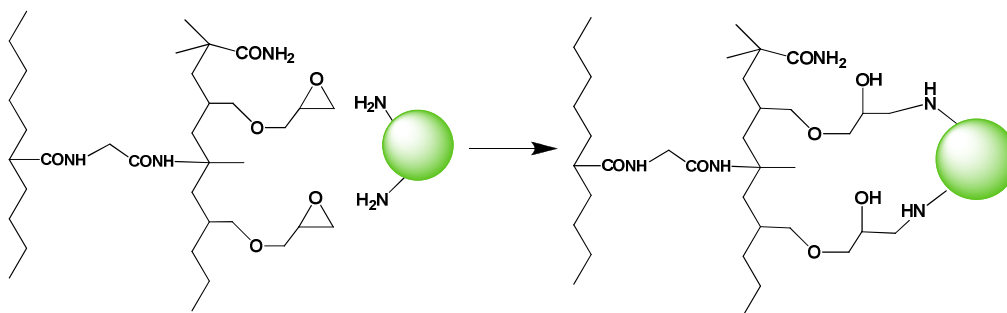
I.2.5.1.1. Polímeros sintéticos macroporosos activados con grupos epóxido

Dentro de la gran variedad de polímeros que pueden obtenerse por síntesis química, el uso de polímeros macroporosos cobra gran auge debido a las múltiples propiedades que les hacen más competitivos respecto a aquellos polímeros que inmovilizan

enzimas sobre su superficie (Santora y col. 2001; Svec 2004; Miletic, Vukovic, y col. 2009). Este tipo de polímeros pueden ser comerciales como: “*Epoxy Sepabeads*” y “*Eupergit C*”, o bien, pueden ser sintetizados en el laboratorio a partir de los monómeros. Sin embargo, es importante mencionar, que existen numerosos ejemplos de inmovilizaciones sobre polímeros macroporosos no comerciales sintetizados en el laboratorio con distintas enzimas: glucoamilasa de *A. niger* (Milosavic y col. 2007), penicilina G acilasa (Koilpillai y col. 1990), invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Prodanović y col. 2001), lipasa de *C. rugosa* (Vaidya y col. 2008) y lipasa B de *C. antártica* (Miletic, Rohandi, y col. 2009), lo que demuestra su amplio uso en el campo de la inmovilización de enzimas.

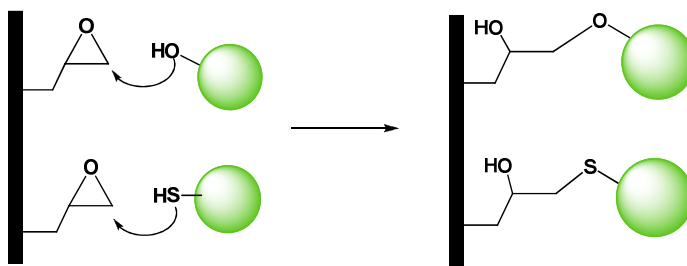
El soporte Sepabeads está constituido por resinas acrílicas que forman partículas esféricas macroporosas con grandes valores de superficies internas y alta congruencia geométrica con proteínas (Mateo y col. 2007; Cerdobbel y col. 2010). Algunas de las enzimas inmovilizadas sobre este tipo de soportes son: fructosiltransferasa de *A. aculeatus* (Ghazi y col. 2005) y la β -galactosidasa de *B. circulans*.(Torres y col. 2012) El Eupergit C, está constituido por pequeñas esferas macroporosas con un diámetro de 100–250 μm , es estable mecánica y químicamente y puede resistir valores de pH desde 0 hasta 14 (Katchalski-Katzir y col. 2000). Sobre este soporte se han inmovilizado diferentes tipos de enzimas, entre ellas algunas glicosidasas como: β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Tu y col. 2006), α -galactosidasa de *A. oryzae* (Hernaiz y col. 2000), β -galactosidasa de *B. circulans* (Hernaiz y col. 2000; Hernaiz y col. 2000). También se ha inmovilizado la lipasa de *C. rugosa*.(Hernaiz y col. 2000; Knezevic y col. 2006)

La inmovilización sobre Sepabeads y Eupergit se realiza mediante la reacción entre los grupos epóxido libres que tiene el polímero en su superficie y los grupos amino libres de las enzimas (generalmente de residuos de lisinas), que realizan un ataque nucleofílico que finaliza con la unión del sistema soporte-enzima mediante una amina secundaria (**Esquema 8**) (Mateo y col. 2002; Sheldon 2007).



Esquema 8. Inmovilización covalente de una enzima sobre Eupergit C. (Sheldon 2007)

Una de las desventajas de utilizar epóxidos como grupos reactivos en la superficie de un soporte durante la inmovilización, es su baja selectividad química, ya que pueden interaccionar con otros residuos libres de aminoácidos de carácter nucleófilo como: tioles presentes en las cisteínas e hidroxilos de serinas, treoninas y tirosinas, formando enlaces covalentes con ellos. Estas reacciones secundarias pueden distorsionar la estructura terciaria de la enzima debido a la formación de múltiples puntos de anclaje, causando pérdidas o modificaciones en su actividad (**Esquema 9**).

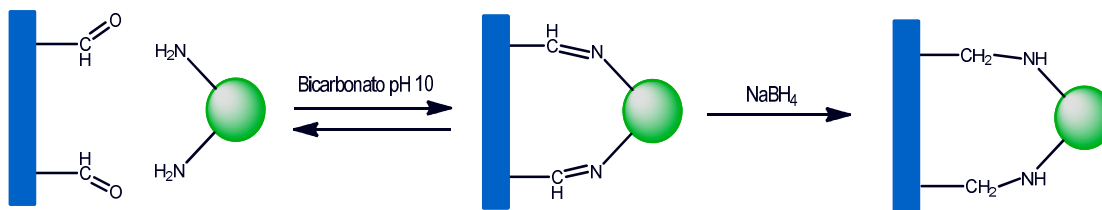


Esquema 9. Inmovilización covalente de enzimas sobre epóxidos mediante residuos hidroxilos o tioles.

1.2.5.1.2. Glioxil agarosas activada con grupos aldehído

Las glioxil agarosas son soportes muy versátiles para inmovilizar enzimas. Se basan en un biopolímero (la agarosa) que han sido modificados para funcionalizar su superficie con grupos aldehído (Guisán 1988). Los grupos aldehídos libres tienen la ventaja de que pueden reaccionar de forma específica con los grupos amino primarios

libres para formar iminas mediante la formación de Bases de Schiff, que luego son reducidas con borohidruro sódico para formar aminas (**Esquema 10**) (Mateo y col. 2006).



Esquema 10. Estrategias de inmovilización sobre glioxil agarosa.

Lamentablemente este tipo de inmovilizaciones requieren un pH igual o superior a 10.0, lo que hace ésta técnica poco compatible con algunas enzimas sensibles a los cambios de pH. Sin embargo, el grupo de investigación del Dr. Guisán, ha desarrollado diversas estrategias de inmovilización con glioxil agarosas, que permiten disminuir el tiempo de reacción a pH alcalino para minimizar la desactivación enzimática. El proceso se basa en la atracción soporte-enzima mediante una funcionalización de la glioxil agarosa. De esta forma se han descrito glioxil agarosas funcionalizadas con cationes metálicos como el Ni (II), que interaccionan con enzimas recombinantes que poseen extremos polipeptídicos con múltiples histidinas (Histag). También se han desarrollado soportes funcionalizados con grupos carboxilo que se cargan de forma negativa a pH 7.0, para atraer enzimas con cargas positivas, por lo que se requiere un punto isoelectrico de la enzima mayor a 7.0. Finalmente, existen soportes funcionalizados con derivados de tipo catión amonio cuaternario que están cargados positivamente a pH 7.0, los cuales requieren que la enzima esté cargada negativamente a ese valor de pH, y por lo tanto su punto isoelectrico sea menor a 7.0 (Mateo y col. 2010).

I.2.5.2. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas

Existen numerosos ejemplos de glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas sobre distintos soportes y posteriormente han sido caracterizadas y utilizadas en la síntesis oligosacáridos. Entre ellas se tiene constancia de las mencionadas en la **Tabla 1**. En dicha tabla se pueden señalar algunos datos importantes sobre las ventajas de utilizar este tipo de enzimas inmovilizadas. Por ejemplo, la β -glicosintasa de *Streptomyces* E383A se ha inmovilizado sobre un soporte de Ni (II)-sefarsa y conserva 93% de actividad tras nueve ciclos de uso, retiene un 83% de su actividad luego de 54 días de almacenamiento a 4°C en tampón fosfato. La enzima libre se empleó en la síntesis de distintos *p*-nitrofenil disacáridos donde los mayores rendimientos alcanzados (77%) se obtuvieron en la síntesis de *p*NF- β -Glc-(1 \rightarrow 3)-Glc, para la misma síntesis, la enzima inmovilizada sobre sefarsa-Ni(II) aumento los rendimientos hasta un 95% (Faijes y col. 2006).

Otro ejemplo de enzima inmovilizada es la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* que ha sido inmovilizada en Duolite A-568 (Maugard y col. 2003). Las reacciones se han realizado con radiaciones de microondas, en tampón y en presencia de algunos disolventes orgánicos como hexanol, hexanodiol, glicerol, dietilenglicol dietil éter. Tanto la enzima libre como la inmovilizada, se han comparado en cuanto a su actividad en la síntesis de galactooligosacáridos, dando mejores resultados la enzima inmovilizada, ya que el equilibrio de reacción se desplaza hacia la síntesis cuando se usa la enzima inmovilizada, mientras que en medio acuoso se favorece la hidrólisis del donador. Otra enzima inmovilizada que ha sido utilizada en presencia de disolventes orgánicos es la β -galactosidasa aislada de la almendra (Ponrasu y col. 2009), aislada por precipitación de los taninos (Hestrin y col. 1995) e inmovilizada sobre perlas de alginato de calcio (Won y col. 2005). Esta enzima ha sido utilizada en presencia de tampón y mezclas de di-isopropil éter, a distintos valores de pH mostrando un comportamiento relativamente predecible en función de las condiciones del medio (Ponrasu y col. 2009).

Tabla 1. Algunas glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas de utilidad en la síntesis de disacáridos y glicoconjugados.

Enzima	Soporte	Productos	Referencias
<i>Streptomyces E383A</i> β -glicosintasa	Sefarosa-Ni ²⁺	Glc- β (1-3)-Glc	(Faijes y col. 2006)
β -galactosidasa <i>Kluyveromyces lactis</i>	Duolita A 568 (resina defenol formaldehído)	Galactooligosacáridos	(Maugard y col. 2003)
β -galactosidasa <i>B. circulans</i> (Biolacta N°5)	Eupergit C	Gal- β (1-4)-GlcNAc	(Hernaiz y col. 2000)
β -galactosidasa <i>B. circulans</i> (β -gal-3)	CNBr-sefarosa	Gal- β (1-3)-GalNAc Gal- β (1-3)-GalNAc- α -Bn	(Naundorf y col. 1998)
β -Galactosidasa de <i>A. oryzae</i> .	Partículas magnéticas F ₃ O ₄ Quitosano	Galactooligosacáridos	(Pan y col. 2009)
β -glucosidasa de almendra	Perlas de alginato de calcio	de 2-O-Glc-Tiamina de	(Ponrasu y col. 2009)

Un factor importante en la inmovilización de enzimas es el aumento de la estabilidad y de la termoestabilidad, así por ejemplo, dos enzimas diferentes provenientes de *B. circulans* se han inmovilizado en soportes como el Eupergit C (Hernaiz y col. 2000) y la Sefarosa activada con bromuro de cianógeno, en ambos casos con una importante retención de la actividad enzimática y con un aumento de la estabilidad (Naundorf y col. 1998). En el primer caso la enzima utilizada es regioselectiva hacia la síntesis de

enlaces $\beta(1-4)$ y en el segundo caso hacia enlaces de tipo $\beta(1-3)$. Efectos similares de aumento de la estabilidad se han obtenido con la β -galactosidasa de *A. oryzae*, que ha sido inmovilizada sobre partículas magnéticas de Fe_3O_4 sobre quitosano, en este caso la inmovilización favorece la estabilidad térmica y también la estabilidad a diferentes valores de pH (Pan y col. 2009).

I.3. Glicosidasas en disolventes sostenibles

Al inicio de la década de 1990, apareció un campo de estudio emergente denominado Química Sostenible, el cual pretende implementar en la industria química procesos respetuosos con el medio ambiente (Anastas 2002; Horvath 2007; Sheldon y col. 2007). Esta disciplina se conoce también como Química Verde y se inscribe dentro de las “tecnologías sostenibles” (Sheldon y col. 2007).

El nombre Química Sostenible fue acuñado inicialmente en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América por Paul Anastas (Anastas 2002), y para el año de 1993 esta entidad crea el Programa de Química Sostenible en dicho país (Sheldon y col. 2007). Anastas y Warner definen esta nueva disciplina como:

“La química sostenible es el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la generación de residuos y sustancias tóxicas”(Anastas y col. 1998).

Otra definición sobre este campo la ofrece el Profesor Sheldon:

“La química sostenible utiliza eficientemente materias primas (preferiblemente de fuentes renovables), elimina residuos, y evita el uso de reactivos y disolventes tóxicos y/o peligrosos para la salud, en la manufactura y elaboración de productos químicos” (Sheldon 2000; Sheldon y col. 2007).

I.3.1. Los principios de la química sostenible

La química sostenible está basada en doce principios que en general pretenden un diseño ambientalmente benigno de productos y procesos (Anastas 2002; Sheldon y *col.* 2007). Estos principios son (Anastas y *col.* 1998):

1. Prevención: es mejor prevenir la formación de residuos que dar tratamiento o limpiarlos una vez creados.
2. Economía atómica: los métodos de síntesis deberían estar diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso de producción en el producto final.
3. Síntesis químicas menos peligrosas (y/o tóxicas): dentro de lo posible, los métodos de síntesis deberían ser diseñados para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana o el ambiente.
4. Diseño de productos químicos seguros: los productos químicos deberían ser diseñados para obtener la función deseada minimizando su toxicidad.
5. Disolventes y auxiliares más seguros: el uso de sustancias auxiliares, como disolventes, reactivos de separación, entre otros, debería ser un hecho innecesario y dentro de lo posible dichas sustancias deben ser inocuas al ser usadas.
6. Diseño con eficiencia energética: los requerimientos energéticos de procesos químicos deberían ser reconocidos por su impacto ambiental y económico y deberían ser minimizados. De ser posible los métodos de síntesis deberían ser realizados a temperatura y presión ambiente.
7. Uso de materias primas renovables: deberían emplearse éstos materiales siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. Reducción de derivados: los derivados utilizados (en procesos de bloqueo, protección, desprotección, etc.) deben ser minimizados e incluso anularse de ser posible ya que cada paso requiere reactivos adicionales y esto genera residuos.
9. Catálisis: los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) se emplearán en lugar de reactivos estequiométricos.

10. Diseño para la degradación: los productos químicos deben ser diseñados para que al final de su función se transformen en productos de degradación inocuos y no persistan en el ambiente.
11. Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación: será necesario desarrollar metodologías analíticas para permitir en tiempo real el seguimiento y control durante el proceso antes de que se produzcan sustancias peligrosas.
12. Química inherente a la seguridad para evitar accidentes: deben seleccionar las sustancias y su forma para minimizar el potencial de accidentes, incluidas emanaciones, explosiones e incendios (Anastas y *col.* 1998).

I.3.2. Disolventes Sostenibles

El concepto de disolventes sostenibles ó verdes es bastante restringido, si se consideran los postulados de la química sostenible ya mencionados. Esto implica analizar muchos supuestos y por ello la clasificación de los disolventes considerados sostenibles no estará exenta de tensiones en su totalidad, ya que difícilmente un mismo disolvente cumple todos los requisitos presentados. Desde esta perspectiva se ha llegado a postular que el disolvente más sostenible en sí mismo no es un disolvente (Kaupp 2003), sin embargo existen notorias ventajas de utilizar disolventes para el desarrollo de reacciones químicas respecto a los medios sin disolventes, algunas de las ventajas citadas son las siguientes (Hernaiz y *col.* 2010):

- Las reacciones ocurren rápidamente y con mayor facilidad cuando los reactivos están disueltos, por que se reducen las restricciones de transferencia de masa.
- Los disolventes pueden afectar los rendimientos y las regioselectividades de una reacción debido a la distinta solvatación de reactivos, intermediarios y estados de transición.
- Los disolventes actúan como medios para transferir el calor ayudando a minimizar los cambios bruscos de temperatura por gradientes más moderados
- Muchas veces los disolventes facilitan la separación y purificación de los productos.

Desde una perspectiva legal, en la Unión Europea, los disolventes deben reunir una serie de características que hagan su uso menos peligroso y más seguro para el medio ambiente, por este motivo se ha limitado el uso de compuestos orgánicos volátiles (VOC's por sus siglas en inglés), ya que muchos de esos vapores son tóxicos para el ser humano, constituyendo una amenaza a la salud de quienes lo utilizan y a la vez pueden potenciar efectos dañinos en el ambiente como daños a la capa de ozono y potenciar el efecto de invernadero (Hernaiz y *col.* 2010).

Tomando en cuenta los aspectos legales sobre la sostenibilidad de los disolventes y los doce principios de la química sostenible, en especial los principios 3, 4 y 5 (Anastas y *col.* 1998; Jessop y *col.* 2008), se han considerado como disolventes sostenibles los siguientes: 1) el agua, 2) disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables, 3) disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental, 4) los disolventes fluorados 5), los líquidos iónicos (LIs), 6) fluidos supercríticos (FSC) (Capello y *col.* 2007; Sánchez-Vicente y *col.* 2009; Pérez y *col.* 2010; Morère y *col.* 2011). Para el presente trabajo se han utilizado disolventes descritos en las anteriores categorías con excepción de los fluidos supercríticos.

I.3.2.1. El agua

Por sus características, el agua se puede considerar el disolvente sostenible por excelencia (Ball 2000), pues no es tóxico para el ser humano ni para el medio ambiente, no es inflamable, disuelve las enzimas en su forma natural, no requiere procesos de manufactura (aunque sí de purificación), etc. Desde una perspectiva de la química sostenible, el agua es un excelente disolvente. Sin embargo desde la perspectiva de síntesis química, muchas veces el agua no es un buen disolvente de reactivos, o resulta no ser un buen disolvente para los productos, lo que obliga a buscar métodos de separación de mezclas para purificar el producto deseado (Hernaiz y *col.* 2010).

I.3.2.2. Disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables

Los disolventes orgánicos tradicionales son en su mayoría derivados del petróleo (una materia prima no renovable) e incumplen algunos de los postulados de la química sostenible (Anastas y *col.* 1998), entre los que se pueden mencionar los siguientes: aumentan la formación de residuos, los procesos de síntesis química en éstos son relativamente peligrosos (lo que requiere cuidados adicionales en el proceso de síntesis), muchos de ellos son volátiles por lo que se aumentan las emisiones de VOC's, además de que por lo general poseen cierta toxicidad para el ser humano y el medio ambiente.

La obtención de disolventes procedentes de fuentes renovables puede disminuir muchas de las características mencionadas anteriormente. En primer lugar constituyen en sí mismos una forma de evitar residuos, pues convierten lo que sería un potencial residuo en un nuevo disolvente, adicionalmente el diseño de estos disolventes puede ser mejorado para cumplir otras características como mejorar su compatibilidad con la salud o el medio ambiente. Dos de los disolventes de fuentes renovables más conocidos y utilizados son el etanol y metanol (Capello y *col.* 2007), pues se pueden producir en grandes cantidades por fermentación en procesos relativamente sostenibles y en sí mismos son sustancias que pueden ser biodegradadas con facilidad.

Por otro lado también existen otros disolventes obtenidos de fuentes renovables que también están ya comercializados por LOBA Chemie y Sigma-Aldrich, y entre ellos podemos citar el ciclopentenil metil éter (CPME), lactato de etilo y el 2-metiltetrahidrofurano (MeTHF) (**Figura 10**) (Hernaiz y *col.* 2010). Otros disolventes derivados de fuentes renovables están en fase de exploración, uno de los ejemplos más claros es el proyecto europeo SolvSafe (Hernaiz y *col.* 2010), constituido por una plataforma innovadora de pequeñas y medianas empresas junto con sectores de investigación, cuya meta ha sido la reducción de disolventes tóxicos/peligrosos

actualmente utilizados, reducir los compuestos orgánicos volátiles enviados a la atmósfera, reducir las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera y aumentar la cantidad de materiales renovables en uso (Hernaiz y col. 2010).

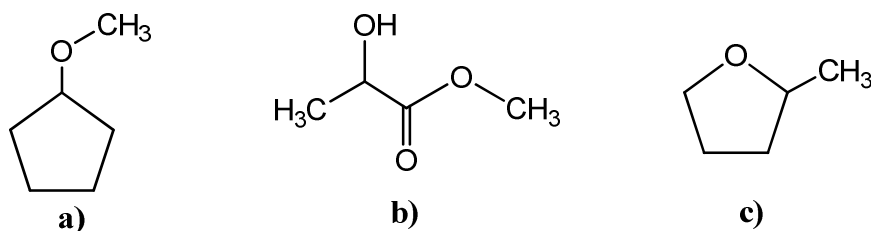


Figura 10. Estructura de algunos disolventes obtenidos de fuentes renovables disponibles comercialmente:(Hernaiz y col. 2010) a) CPME; b) lactato de metilo; c) MeTHF.

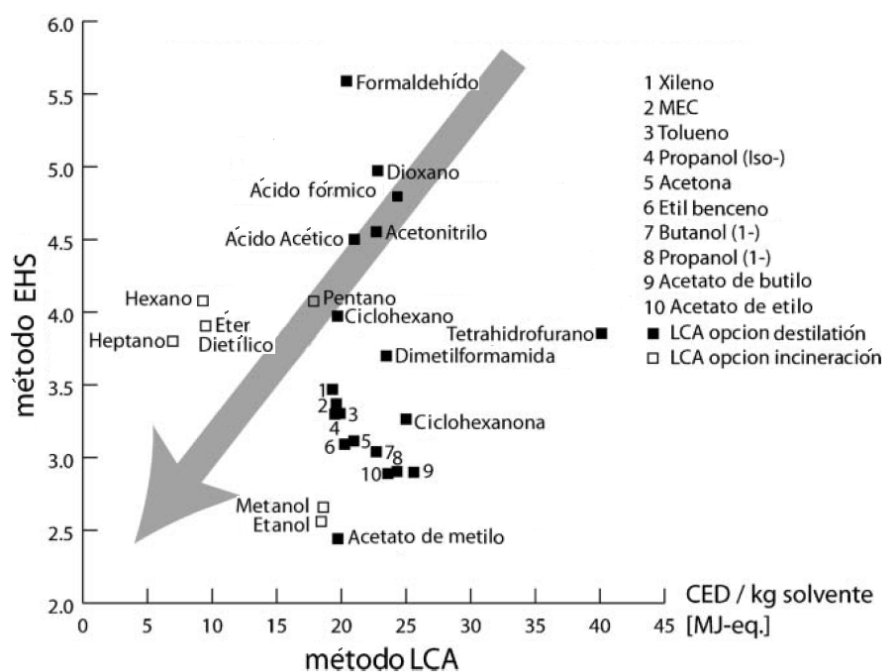
Finalmente, es importante comentar que el actual aumento en la producción de biodiesel (en parte debido al innegable hecho de que los combustibles fósiles son fuentes en proceso de agotamiento) ha conllevado un aumento en su principal subproducto de manufactura: el glicerol, el cual constituye cerca de un 10% de la masa total en el proceso de producción (da Silva y col. 2009). Por lo anterior, es posible prever un aumento masivo en la producción de glicerol como subproducto de la industria del biodiesel, lo cual lo convierte en una posible materia prima a utilizar derivada de la biomasa. Por este motivo se ha explorado la posibilidad de sintetizar y caracterizar disolventes derivados del glicerol, como una alternativa de aprovechamiento de éste subproducto de la industria del biodiesel (Dasari y col. 2005; Wolfson y col. 2007; García y col. 2010).

I.3.2.3. Disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental

En un estudio publicado en el año 2007 (Capello y col. 2007), se realizó un análisis sistemático de 26 disolventes tradicionales de uso común en la química orgánica. El análisis se hizo utilizando dos enfoques, el primero de ellos denominado EHS (del inglés: “*enviromental, health and safety*”, ambiente, salud y seguridad) que se basa en los riesgos potenciales de las sustancias químicas (irritación, toxicidad,

inflamabilidad, etc.) y el segundo se conoce como LCA (del inglés: “*life cycle assesment*”, evaluación del ciclo de vida), que contempla factores como las emisiones al ambiente durante la vida útil del mismo: producción, uso, reciclabilidad potencial (destilación) y disposición final (en algunos casos incineración, como medida más benigna para el ambiente).

Según esta perspectiva, los disolventes orgánicos más sostenibles son: el etanol, el metanol y el acetato de metilo. Otros disolventes relativamente sostenibles, bajo este estudio, considerando que pueden ser destilados y reutilizados (o en su caso incinerados) son: acetato de etilo, acetato de butilo, etilbenceno, 1-propanol, 1-butanol, xileno, etilmetilcetona, tolueno, isopropanol y la acetona (**Esquema 11**).



Esquema 11. Evaluación de la sostenibilidad de disolventes orgánicos tradicionales basados en la escala LCA y EHS. La flecha gris indica la tendencia hacia disolventes más sostenibles. (Imagen tomada y traducida de la referencia original(Capello y *col.* 2007)).

I.3.2.4. Disolventes orgánicos fluorados

La extracción por disolvente es una técnica muy utilizada en química orgánica, siendo los disolventes más utilizados el éter dietílico, diclorometano, cloroformo y agua. Este proceso se realiza normalmente mediante la explotación de la inmiscibilidad de dos fases líquidas, por lo general una acuosa y otra orgánica (De Simone 2002). En este sentido los compuestos fluorados se conocen como la "tercera fase líquida", ya que los disolventes orgánicos, el agua y los compuestos fluorados son mutuamente inmiscibles (**Figura 11**) (De Simone 2002). Esta propiedad es a menudo una función dependiente de la temperatura y permite obtener a mayores temperaturas un sistema monofásico que luego desaparece a bajas temperaturas, facilitando obtener el producto deseado en una de las fases (Horváth y col. 1994; De Simone 2002; Xiang y col. 2002; Wende y col. 2003; Hobbs, Kirke, y col. 2007; Correa da Costa y col. 2011).

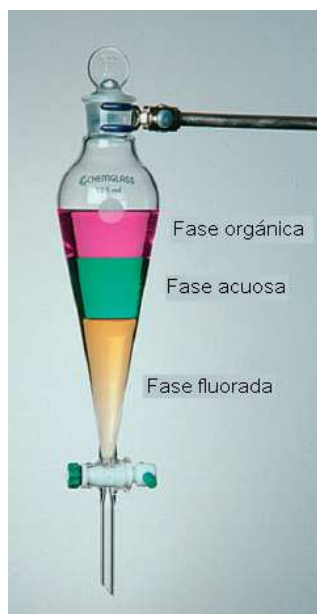


Figura 11. Fotografía de tres fases: orgánica, inorgánica y fluorada.

Dada su variable solubilidad, los disolventes fluorados pueden ser empleados en reacciones químicas a temperaturas en las que solo existe una fase y posteriormente, se pueden enfriar hasta separar los reactivos y productos en la fase correspondiente. Esta característica aumenta la eficiencia de los sistemas de reacción y permite además recuperar el disolvente disminuyendo su impacto en el ambiente.

Algunos disolventes fluorados (DF) son derivados perfluorados de alcanos, éter dietílico o trietilaminas. Estos disolventes fluorados se caracterizan por que sus interacciones moleculares son muy débiles, teniendo un menor punto de ebullición y una menor polaridad que los correspondientes alcanos (Khmelnitsky y col. 1991; Pérez y col. 2010). El disolvente perfluorado más barato

disponible comercialmente es el conocido como “FC-72” ó perfluorohexano (C_6F_{14}). Sin embargo se han descrito muchas reacciones en el perfluorometil ciclohexano (PFMC), que es en si mismo una alternativa más costosa. Sin embargo, el uso a gran escala de DF se encuentra limitado por el alto coste que supone (Khmelnitsky y *col.* 1991; Hobbs and Thomas 2007).

Respecto a la síntesis enzimática de glicoconjugados, los DF se han utilizado en forma de fluidos supercríticos (fluoroformo) con la β -galactosidasa de *B. circulans*, para la síntesis del 1-*O*-(5-fenilpentil)- β -D-galactopiranosido (Mori y *col.* 2002) y con lipasas para catalizar reacciones de transesterificación (tetrafluoroetano y fluoroformo) (Horváth 2005).

1.3.2.5. Líquidos iónicos (LIs)

Los líquidos iónicos (LIs) son una nueva clase de disolventes que han sido recientemente desarrollados y su uso se ha extendido ampliamente a varios campos de estudio, entre ellos, reacciones bajo catálisis enzimática (Kragl y *col.* 2002; van Rantwijk y *col.* 2003). Los LIs generalmente están formados por cationes orgánicos y aniones que pueden ser, tanto orgánicos como inorgánicos. Actualmente son sustancias que despiertan gran interés en cuanto a su uso, debido a sus muchas propiedades: son líquidos a temperatura ambiente (Galínski y *col.* 2006; van Rantwijk y *col.* 2007), térmicamente estables (Kosmulski y *col.* 2004), polares (Dzyuba y *col.* 2002), relativamente inertes (Chiappe y *col.* 2005), tienen una presión de vapor casi nula (Earle y *col.* 2006), no son inflamables (Fox y *col.* 2003), presentan una buena conductividad iónica (Tsuzuki y *col.* 2005), bajos puntos de fusión (Wasserscheid y *col.* 2000) y amplias ventanas electroquímicas (Hagiwara y *col.* 2000).

Los bajos puntos de fusión de los LIs (generalmente inferior a 100°C) (Welton 2004), se han explicado por el gran tamaño que poseen sus iones y la pequeña carga de los mismos, por lo que la energía necesaria para romper los enlaces entre éstos es más

baja que la energía requerida para disociar una sal clásica como el cloruro de sodio (Dupont y *col.* 2006). Respecto a su polaridad, los estudios espectroscópicos sugieren que es similar a la de los alcoholes de bajo peso molecular como el metanol y el etanol (Poole 2004).

Muchas de las propiedades de los LIs tales como viscosidad, presión de vapor, polaridad, y solubilidad, entre otras, se pueden modificar con una correcta selección de los aniones y cationes, llegando incluso a diseñar LIs solubles en disolventes como hexano o incluso insolubles en agua (Wasserscheid y *col.* 2003; Poole 2004). Algunos de éstos disolventes pueden disolver cantidades relativamente grandes de hidratos de carbono, hasta 200 g/l de sacarosa, glucosa, lactosa y ciclodextrina (Liu y *col.* 2005), razón por la cual pueden ser una fuente de interés en la síntesis de enzimática de oligosacáridos.

Inicialmente estas sustancias se consideraron como disolventes sostenibles útiles para procesos catalíticos (Sheldon 2001), ya que se pueden reciclar (Gathergood y *col.* 2004), aumentan en muchos casos los rendimientos y se pueden utilizar en lugar de disolventes orgánicos volátiles (incluso a temperaturas altas para reacciones enzimáticas y con mejores rendimientos), evitando con esto la emisión de vapores a la atmósfera (Sheldon 2001) y de riesgos a la salud humana (por inhalación). Por éste motivo, existen varias publicaciones que promocionan los LIs como disolventes sostenibles y de notorios resultados en catálisis enzimática (Madeira Lau y *col.* 2000; Earle y *col.* 2002; Park y *col.* 2003). Algunos autores sostienen que la biodegradabilidad de los LIs puede ser, en algunos casos, difícil de alcanzar y que la ecotoxicidad de los mismos puede superar la de disolventes orgánicos tradicionales (García 2005), sin embargo la estructura de cada LI puede ser utilizada para estimar teóricamente las probabilidades de su ecotoxicidad, lo cual es una herramienta que permite evitar el escalado de reacciones y procesos que luego pueden ser perjudiciales ambientalmente (Jastorff y *col.* 2003).

I.3.3. Galactosidasas en disolventes sostenibles

Las galactosidasas son enzimas que tradicionalmente han sido utilizadas en medios acuosos tamponados, tanto para las reacciones de hidrólisis como de síntesis. Sin embargo, el uso de disolventes o cosolventes con este tipo de enzimas es un tema poco explorado. Por ejemplo la β -galactosidasas de *E. coli* y de *Kluyveromyces fragilis* han sido utilizadas caracterizadas en mezclas con hasta un 50% v/v de disolvente orgánico: acetona, acetonitrilo, monoglima, diglima, triglima y tetraglima entre otros. En estas condiciones presentaron menos del 40% de actividad hidrolítica (medida como Velocidad máxima (V_{max}) en cinéticas tipo Michaelis-Menten) (Yoon y col. 2005). Se conocen también datos de la β -galactosidasa de *A. oryzae* en la síntesis de glicoconjugados con 1-feniletanol (Majumder y col. 2008).

Una de las enzimas de interés para este trabajo es la β -galactosidasa de *B. circulans*, que tolera disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona y *terc*-butanol en bajas cantidades debido a que puede ser desnaturalizada, sin embargo en *terc*-butanol al 10% parece mostrar mejores resultados de actividad (Bridiau y col. 2010). Por otra parte, muchos de los datos medidos no corresponden a disolventes que se puedan considerar sostenibles, sino disolventes orgánicos tradicionales. En contraposición a la literatura, recientemente, en nuestro grupo de han desarrollado estudios de síntesis de disacáridos y glicoconjugados en presencia de disolventes derivados del glicerol (García y col. 2010) con la β -galactosidasa de *E. coli*. (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y col. 2011).

Los LIs ofrecen una serie de ventajas en la síntesis de carbohidratos debido a que éstos pueden ser solubles o insolubles, permitiendo obtener distintos procesos de transporte, separación y purificación de los carbohidratos (Sheldon y col. 2002; Murugesan y col. 2005; Prasad y col. 2010), sin embargo su uso junto con las β -galactosidasas es todavía un campo limitado. Se tiene constancia de que las β -galactosidasas del preparado comercial Biolacta de *B. circulans* (Kaftzik y col. 2002), *Pyrococcus furiosus* (Lang y col. 2006) y *Aspergillus oryzae* (Singh y col. 2010), se

han empleado en presencia de LIs. En el primer caso se han obtenido mayores rendimientos en la síntesis del disacárido (Gal β (1-4)GlcNAc) y mayor estabilidad de la enzima (Kaftzik y col. 2002), mientras que la enzima de *P. furiosus*, ha presentado moderados incrementos en la actividad sintética de la enzima (aproximadamente un aumento del 10% respecto a las condiciones en agua), pero también se han presentado efectos inhibitorios a altas concentraciones del LI (Lang y col. 2006). Respecto a la enzima de *Aspergillus oryzae*, se han obtenido mayores velocidades de hidrólisis del sustrato donador (oNF- β -Gal) (Singh y col. 2010). Recientemente, en nuestro grupo de investigación se han hecho estudios del efecto de LIs sobre la actividad de la enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27, provocándose un aumento en la actividad y un cambio de regioselectividad hacia el Gal- β (1-4)-GlcNAc (Sandoval, Cortés, y col. 2012).

I.3.4. Estudio de la influencia de los disolventes sostenibles en la actividad enzimática

Los disolventes pueden ejercer numerosos efectos sobre las enzimas, que en muchos casos no son fáciles de dilucidar. El entorno químico de una enzima y en particular su centro activo, durante una reacción química, es muy complejo. Existen iones (en caso de que se use un medio tamponado), sustratos y disolventes, valores de pH y temperaturas, que afectan las interacciones entre las distintas partes de la reacción. Dada la complejidad del sistema, pueden darse interacciones tales como: enzima-disolvente, enzima-sustrato, sustrato-sustrato, sustrato-disolvente. Por ello resulta difícil comprender la globalidad de factores que determinan el resultado final de una reacción enzimática. En la actualidad, existen distintas herramientas tecnológicas que permiten medir en condiciones bastante sensibles y exactas, algunas de las interacciones que pueden darse durante una determinada reacción química.

En el caso de las reacciones enzimáticas, se requiere desarrollar sistemas de alta sensibilidad y bajo consumo de muestra. Dentro de las opciones existentes para

estudiar las interacciones moleculares se puede la espectroscopía de fluorescencia, que es una herramienta útil para detectar cambios estructurales de las proteínas debido a la presencia de disolventes orgánicos en el medio de reacción. Otra herramienta que permite predecir, interpretar o explicar las posibles interacciones en ambientes microscópicos, es la bioinformática, a través del modelado molecular y el “*docking*” (Cardin y *col.* 1989; Uppenberg y *col.* 1995; Fotin y *col.* 2004; Stone y *col.* 2007).

En el presente trabajo se utilizarán la espectroscopía de fluorescencia y el modelado molecular como herramientas para el análisis de los resultados obtenidos.

I.3.4.1. Espectroscopia de Fluorescencia

La fluorescencia es el resultado de la emisión de luz fotoinducida por un grupo fluoroforo. Este fenómeno requiere de una excitación previa, por medio de una radiación incidente a una determinada longitud de onda, que provoca la excitación de los electrones a un nivel energético excitado de la molécula (singlete excitado). La relajación de este estado provoca la emisión de luz con un máximo de emisión en una longitud de onda mayor que la inicial (Hovius y *col.* 2000; Michalet y *col.* 2006). Este fenómeno esta asociado a la presencia de fluoroforos que son estructuras rígidas y conjugadas que estabilizan el estado excitado. En el caso de las proteínas, la emisión de fluorescencia está directamente relacionada con la presencia del triptófano (anillo rígido conjugado) y en menor medida de la tirosina y de la fenilalanina (Vivian y *col.* 2001). Una alta presencia de triptófanos en la proteína garantizará un espectro de emisión intenso y fácil de medir, incluso en equipos de baja sensibilidad.

Los cambios en el micro-entorno químico de un triptófano modifican la estructura del complejo excitado y con ello la longitud de onda de emisión y con ello los valores de longitud de onda en los que se obtienen los máximos de fluorescencia. Esta información permite obtener datos sobre la estructura terciaria de una proteína y permite medir el efecto de factores externos como el pH o agentes químicos sobre su

estructura terciaria (particularmente el entorno de los triptófanos), ya que la presencia de sustancias que afectan la estructura de la proteína repercutirá directamente en su espectro de fluorescencia (Vivian y *col.* 2001; Peng y *col.* 2004).

I.3.4.2. Herramientas de Bioinformática

Las simulaciones por ordenador han probado ser herramientas eficaces para entender las estructuras de las proteínas y sus dinámicas con el medio (Colombo y *col.* 2000; Colombo y *col.* 2002; Eswar y *col.* 2003). Existen varios programas informáticos, bases de datos y servidores que ofrecen numerosas herramientas para analizar y predecir características estructurales de las proteínas como por ejemplo: punto isoeléctrico, puentes disulfuro, plegamientos, etc. Estas predicciones se realizan en su mayoría basándose en algoritmos creados por homología con información de proteínas previamente caracterizadas.

I.3.4.2.1. Bases de datos

En los últimos años las bases de datos reúnen la información de genes y proteínas de numerosos organismos, así también ofrecen importantes herramientas de comparación entre la secuencias de un gen o proteína, lo que ha facilitado el acceso a este tipo de información a nivel mundial. Dentro de las bases de datos de mayor importancia para el análisis de proteínas se pueden citar las siguientes:

NCBI: El NCBI es la base de datos del “*Nacional Center for Biotechnology Information*” de los Estados Unidos de América. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Esta es una base de datos con múltiples funciones, ofreciendo: base de datos de literatura (PubMed, especializada en biomedicina), nucleótidos, herramientas para análisis de secuencia (GenBank) y herramientas para el diseño de estructuras

tridimensionales, entre otras. De ellas, una de las más utilizadas para el análisis comparativo de proteínas es el alineamiento de secuencias proteicas por medio de la herramienta “BLAST” (“*Basic Local Alignment Search Tool*”) (Altschul y col. 1990), la que permite obtener valores porcentuales de identidad entre dos ó mas proteínas.

Protein Data Bank (PDB): El PDB (Bernstein y col. 1977), es una base de datos online del “*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*” de los Estados Unidos de América, que acepta el depósito de estructuras tridimensionales de proteínas. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Las macromoléculas disponibles en esta base de datos pueden encontrarse aisladas o bien en forma de complejos: proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y macromolécula-ligandos. Los modelos depositados provienen fundamentalmente de difracción de rayos-X y algunos de espectroscopía de RMN. A cada una de las entradas se les asigna un código de identificación formado por 4 caracteres denominado “PDB ID”.

ExPASy (Expert Protein Analysis System): Esta es una herramienta online del “*Swiss Institute of Bioinformatics*” que permite determinar características de una determinada enzima a partir de su secuencia de aminoácidos en formato “*Fasta(Fast Alignment)*” (Pearson y col. 1988). Su dirección web es la siguiente:

<http://web.expasy.org/>

Las herramientas más populares en la predicción de propiedades de proteínas son “ProtParam” (Gasteiger y col. 2005) y “SWISSPROT” (Boeckmann y col. 2003). En la primera de ellas se obtienen varios parámetros estimados a partir de una secuencia escrita en formato *FASTA* (Pearson y col. 1988), tales parámetros son: peso

molecular, punto isoeléctrico teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción molar, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y promedio de hidrofobicidad. En la segunda de ellas se indexan todas las proteínas secuenciadas y contiene múltiples referencias a otras bases de datos.

CAZy: Para el presente trabajo, CAZy ("*Carbohydrate Active Enzymes*") (Cantarel y col. 2009) es una base de datos de gran utilidad, ya que ofrece información especializada en visualización y análisis de información genómica, estructural y bioquímica en enzimas activas sobre carbohidratos. La página ha sido desarrollada por el grupo de glicogenómica en arquitectura y función de las macromoléculas Biológicas de la Universidad del Mediterráneo en Provenza, Francia. Su dirección web es la siguiente:

<http://www.cazy.org/>

La base de datos CAZy inició como página web en 1998 y en ella se describe las familias de los módulos catalíticos estructuralmente relacionados y los hidratos de carbono vinculados (o dominios funcionales) de las enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos.

I.3.4.2.2. Modelado molecular y docking.

Con la gran cantidad de proteínas registradas en las distintas bases de datos, muchas de ellas en formato 3D a partir de las estructuras cristalizadas correspondientes, existen múltiples oportunidades para interpretar y predecir resultados entre proteínas y distintas moléculas con las cuales interaccionan éstas.

Para proteínas cuya estructura cristalina no está disponible, se requiere alinear correctamente la secuencia de aminoácidos con proteínas de similitud estructural y funcional similar, este trabajo se puede realizar con distintos servidores que ofrecen esta herramienta, como por ejemplo: MUSCLE (Edgar 2004). La homología puede

ser estudiada por herramientas ofrecidas en servidores como SWISS-MODEL (Schwede y *col.* 2003; Arnold y *col.* 2006) y “CPHmodels-3.0” (Nielsen y *col.* 2010). En otros casos, se pueden generar predicciones basadas en la interpretación de estructuras cristalizadas y analizadas previamente por difracción de rayos X, como ha sido el caso de la β -galactosidasa de *T. thermophilus* A4, cuya estructura cristalizada ha sido analizada por medio de software para comparar su centro activo con el de otras enzimas como la β -galactosidasa de *E. coli* (Hidaka y *col.* 2002).

El docking es la principal herramienta de trabajo en las simulaciones por ordenador que pretenden explicar fenómenos relacionados con catálisis enzimática. Esta herramienta se basa en el anclaje de moléculas sobre las proteínas con las que interaccionan. Su estudio requiere de contemplar numerosos parámetros como: tiempo de simulación puentes de hidrógeno, fuerzas columbimétricas, efectos estéricos de las moléculas, etc. Del anclaje obtenido se realizan superimposiciones que simulan las distancias entre los átomos de la proteína cuando está anclada o cuando está libre, permitiendo analizar la flexibilidad o rigidez de la misma (Armougom y *col.* 2006; Damm y *col.* 2006; Edgar 2010).

De los paquetes de software que permite realizar distintas pruebas en sistemas donde se simula un complejo enzima-ligando uno de los más usados es el programa Autodock (Morris y *col.* 2009), el cual permite simular la unión covalente de los ligandos, utilizando tanto un método basado en la red de acoplamiento y una modificación de la técnica de cadenas laterales flexibles. Sin embargo se pueden mencionar otros paquetes informáticos como PRODRG server (Schuttelkopf y *col.* 2004), Massively Parallel Quantum Chemistry Program (MPQC) (Janssen y *col.* 2004), GROMOS y GROMACS.(Hess y *col.* 2008)

I.4. Estudios de interacciones moleculares entre glicoestructuras y ligandos

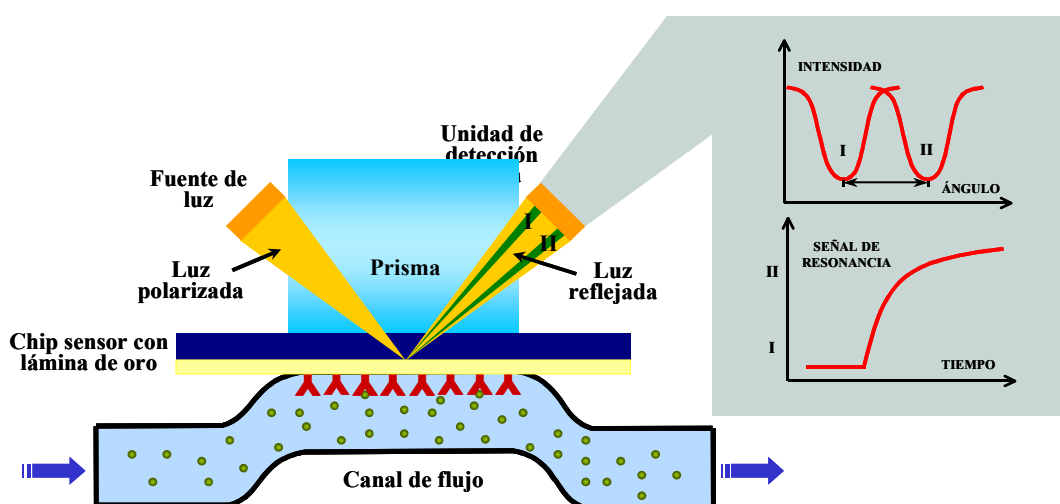
La necesidad de aumentar la comprensión de las interacciones moleculares entre glicoestructuras, como pueden ser los glicodendrimeros o los glicopéptidos, con sus respectivos ligandos, ha provocado el desarrollo de sistemas de alta sensibilidad y bajo consumo de muestra. Dentro de las opciones existentes para estudiar las interacciones moleculares se pueden citar la resonancia magnética nuclear (RMN) por medio de diferencia de la transferencia de saturación (STD, del inglés Saturation Transfer Difference) que permite determinar los sitios de unión entre dos moléculas que interactúan entre sí (Klein y *col.* 1999; Wang y *col.* 2004; Wen y *col.* 2005), y la resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance), una herramienta que permite inmovilizar macromoléculas y fluir sobre ellas una solución de analito o ligando, cuantificando la asociación y disociación entre ambas (D. G. Myszka 1997; Myszka y *col.* 2000; Rich y *col.* 2000; Homola 2003). Estas dos técnicas serán utilizadas en este trabajo para el estudio de interacciones moleculares.

I.4.1. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)

La técnica de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) permite llevar a cabo el análisis cinético de interacciones moleculares de un modo accesible, en tiempo real y sin la necesidad de marcar las moléculas. Como la detección es independiente de la naturaleza química de las muestras analizadas, en principio, todo tipo de moléculas son susceptibles de estudio por esta técnica: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos, cofactores o carbohidratos (Karlsson 2004).

La técnica de SPR se basa en la inmovilización de una molécula que actúa como receptora sobre una superficie de oro funcionalizado, con un grosor nanométrico. Esta superficie constituye en si misma un biosensor. Los biosensores de SPR (Esquema 12) detectan cambios en el índice de refracción en las proximidades de la superficie

de oro, utilizando luz polarizada, en la interfaz entre el soporte sólido y el medio líquido. La molécula inmovilizada pasa a formar parte de la superficie que es irradiada con un haz de luz, cuyo índice de refracción se modifica al fluir una disolución de ligando sobre la superficie ya que al fluir la disolución de analito se obtiene una asociación, mientras que al dejar de fluirla y pasar un medio distinto al analito (por ejemplo tampón) se obtiene una disociación, este efecto se mide en unidades de respuesta abreviadas como “RU” por sus siglas en inglés, normalmente se asocia el valor de 1 RU como el equivalente a 1 pg/mm^2 . Durante el experimento de SPR (D. G. Myszka 1997; Pattnaik 2005).

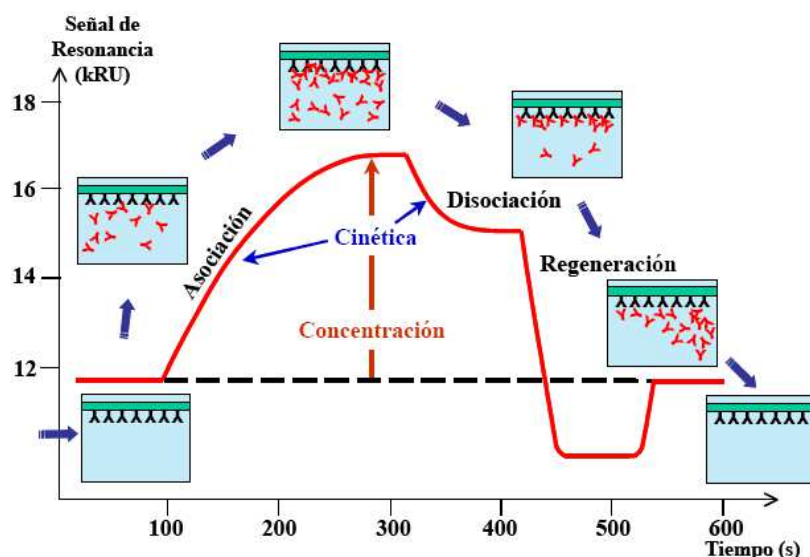


Esquema 12. Esquema del funcionamiento de un SPR. La luz incide sobre la superficie funcionalizada que está en contacto con una disolución de analito que fluye sobre ella. El cambio del índice de refracción es medido y con ello la interacción entre el receptor y el ligando.

Los ensayos se llevan a cabo en presencia de un blanco, que es una superficie con las mismas características que la superficie original antes de inmovilizar al receptor, para obtener un valor que luego es restado a los ensayos de la superficie activada. La información obtenida genera un gráfico denominado sensograma, en el cual se analizan los valores obtenidos entre la celda de interés y la celda control (**Esquema 13**) (D. G. Myszka 1997). Con esta técnica se pueden obtener datos de cinéticas

dentro de una gran variedad de interacciones macromoleculares, que incluyen sistemas de alta y baja afinidad entre el receptor y el ligando (Pattnaik 2005; Rich, Papalia, y *col.* 2009).

El análisis cinético de la interacción, requiere eliminar los posibles falsos positivos, mediante la sustracción de la respuesta obtenida con la superficie de control. El modelo más simple es el de la interacción uno-uno (Langmuir), que puede ser aplicado en la mayoría de casos, sin embargo en determinadas situaciones, los procesos de asociación y disociación son tan rápidos que no permiten recoger información, lo que obliga a alcanzar el estado estacionario de la interacción, y con ello determinar la constante de disociación en el equilibrio (K_D) o de asociación (K_A) de la interacción entre analito y ligando (Homola 2008).



Esquema 13. Representación de un sensograma. Inicialmente no hay inyección de analito y se observa una línea base. Cuando se inyecta el analito la señal aumenta a medida que se produce la interacción, es la fase da asociación. Cuando se deja de inyectar analito, se libera el espontáneamente el que está unido en la fase de disociación. Por último, se inyecta una disolución para recuperar la línea base evitando que quede analito asociado al ligando.

Parte de los avances en la técnica de SPR, radican en el diseño de los experimentos, en la actualidad existe gran variedad de chips funcionalizados, que ofrecen diversas alternativas para inmovilizar el receptor pero además existe la posibilidad de preparar chips en el laboratorio que luego son evaluados en el SPR (Smith y col. 2003; Suda y col. 2006; Linman y col. 2008; Muñoz y col. 2008; Munoz, Andre, y col. 2009), esto permite ampliar y mejorar las opciones de inmovilización y de cuantificación de interacciones moleculares. Gracias a los avances existentes y las numerosas opciones de trabajo en el SPR, muchas interacciones entre glicoestructuras y sus ligandos han llegado a ser cuantificadas (Duverger y col. 2003; Fernández-González y col. 2007; Hurtado-Gómez y col. 2008; Karamanska y col. 2008; Muñoz y col. 2009; Muñoz y col. 2010; Safina y col. 2011).

La aplicación más común del SPR en glicobiología es el estudio de reconocimiento molecular carbohidrato-proteína. La mayoría de estos estudios de interacción carbohidrato-lectina se llevan a cabo con el glicoconjugado inmovilizado (Duverger 2003), puesto que de ese modo se intenta mimetizar la presentación de los glicoconjugados en las membranas biológicas. Sin embargo, la otra posibilidad, el inmovilizar la lectina en la superficie, ha sido por lo general menos empleada aunque según Shinohara y col. (1997) las constantes cinéticas y de afinidad determinadas son iguales por ambas aproximaciones.

I.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN proporciona un número elevado de técnicas para llevar a cabo el estudio de interacciones moleculares (Claridge 1999; Jiménez-Barbero 2003). Estas interacciones pueden ser estudiadas bajo condiciones muy diversas y con diferentes grados de complejidad (Kogelberg 2003). Desde la interacción de proteínas con proteínas en soluciones acuosas, o con proteínas embebidas en membranas, hasta la interacción de moléculas más pequeñas como los carbohidratos con proteínas que reconocen específicamente residuos glicosídicos. En este aspecto han sido muchos los estudios llevados a cabo en este tipo de interacciones, que se

puede analizar desde dos puntos de vista: por un lado, se puede estudiar la interacción desde el punto de vista de la proteína (receptor), y por otro, se puede basar el estudio en el análisis de las señales del carbohidrato o ligando.

A pesar de que se obtenga una mayor información de la interacción desde el punto de vista de las señales del receptor, se aplican con mayor frecuencia las técnicas basadas en los cambios en las señales del ligando. Entre los experimentos empleados para llevar a cabo esta determinación se encuentran los experimentos de transferencia del efecto nuclear Overhauser (tr-NOE) (Balaram 1972), que detectan la diferente movilidad rotacional del ligando en el estado libre frente al estado asociado y los experimentos de STD (Mayer 1999; Meyer 2003), que detectan la magnetización que se transfiere del receptor al ligando en el proceso de asociación.

I.4.2.1. Experimentos de diferencia de la transferencia de saturación (STD)

Los experimentos de STD se fundamentan en las diferentes propiedades entre la forma libre del ligando y el tamaño del complejo debidas principalmente a la diferencia de tamaño entre ambas (Mayer 1999; Mayer 2001; Meyer 2003). La utilidad de esta técnica radica en el potencial que tiene para la búsqueda de compuestos que se unan a ligandos y además la capacidad de determinar los epítomos de reconocimiento del ligando a nivel atómico (Mayer 1999) El experimento se basa, como ya se ha dicho, en la transferencia de la saturación desde la proteína al ligando en el estado asociado y que por su parte está en equilibrio con su estado libre en disolución, siendo en la forma libre en la que se detecta la saturación. De este modo, la sustracción del espectro en el que se saturan las resonancias de la proteína del espectro en el que no se saturan, se obtiene un nuevo espectro, diferencia, en el que sólo se observan las señales del ligando que se hayan visto afectadas por la saturación.

Con los experimentos STD, es posible detectar interacciones ligando-proteína cuando las constantes de disociación están entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las aplicaciones de estos experimentos de STD son muy variadas, por ejemplo se ha descrito la posibilidad de determinar los protones de los ligandos que interaccionan con la proteína de una mezcla de moléculas procedentes de extractos o bibliotecas (Klein 1999; Meinecke y *col.* 2001; Moller y *col.* 2002; Claasen y *col.* 2005).

El STD, también permite llevar a cabo estudios de reconocimiento del sustrato por parte de una enzima (Berteau 2003; Angulo 2006; Blume 2006). Por ejemplo, el grupo del Prof. Peters y *col.* se ha estudiado la especificidad de la galactosiltransferasa humana responsable de la síntesis del determinante antigénico del grupo sanguíneo B por el sustrato donador (Angulo 2006; Blume 2006). Además, tiene aplicación para llevar a cabo un mapeo refinado de los epítomos de diferentes glicoconjugados en su unión a proteínas que reconocen selectivamente carbohidratos. Por ejemplo, Bhunia y *col.* (2004) y Haselhorst y *col.* (2001) han empleado estos experimentos STD para llevar a cabo el reconocimiento de sialil Lewis^x mediante dos lectinas específicas de estos residuos. Incluso, para la aplicación de los experimentos STD a células enteras, se ha descrito una técnica de doble diferencia (STDD-NMR) que básicamente lo que hace es filtrar la señal de fondo de la célula (Claasen y *col.* 2005).

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la obtención de biocatalizadores útiles en la síntesis de glicoestructuras de interés biológico en condiciones sostenibles. Para el desarrollo de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda de glicosidasas de organismos mesófilos y termófilos útiles en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico.
2. Clonaje y caracterización de la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 aplicada a la síntesis de disacáridos de interés biológico.
3. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico (Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc) utilizando la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 en presencia de disolventes sostenibles.
4. Análisis estructural mediante espectrometría de fluorescencia y modelado molecular de la influencia de disolventes sostenibles en las reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382.
5. Inmovilización mediante diferentes aproximaciones (polímeros macroporosos activados con grupos epóxido y glioxil agarosas activadas con grupos aldehído) de la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382.
6. Obtención de glicosintasas útiles en la síntesis de glicoconjugados (β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 y TmGalA D327G de *Thermotoga maritima*.) y caracterización del efecto de disolventes sostenibles sobre su actividad.

7. Utilización de glicosiltransferasas o sialiltransferasas ($\alpha 2,3$ SiaT y $\alpha 2,3$ SiaT de *Photobacterium* sp) en la síntesis de glicodendrimeros funcionalizados con ácido siálico y derivados.
8. Estudio de la interacción carbohidrato-proteína de los glicodendrimeros preparados en el apartado 8 mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
9. Utilización de diferentes enzimas (glicosidasas, lipasas, proteasas, oxidasas) para la modificación estructural de antibióticos de tipo glicopéptido.
10. Estudio de interacciones de glicopéptidos con precursores de peptidoglicano bacteriano y superficies hidrofóbicas mediante SPR.

III.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Capítulo 1. Búsqueda de glicosidasas útiles en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico

Como se ha explicado en el apartado I.1 de la Introducción, para profundizar en el conocimiento acerca de las diferentes funciones de los glicoconjugados, es necesario disponer de herramientas que permitan obtener estos compuestos a gran escala y con un alto grado de pureza. Por ello, el objetivo inicial de esta Tesis Doctoral fue la obtención de nuevas enzimas glicosidasas capaces de llevar a cabo reacciones de síntesis de oligosacáridos. En este Capítulo se utilizaron técnicas de microbiología, biología molecular y bioinformática, para realizar una búsqueda de enzimas mesófilas y termófilas que pudieran realizar reacciones de transglicosidación.

III.1.1. Selección de organismos mesófilos productores de glicosidasas

Se partió de una colección de microorganismos perteneciente a nuestro grupo de investigación, todos ellos catalogados como nivel 1 de seguridad biológica, por lo que no es necesario tomar especiales medidas de seguridad en su manejo, crecimiento y conservación. Esta colección se denominó colección BTG.

Los microorganismos de la colección BTG no estaban identificados, así que se comenzó por la revitalización generalizada de todas las bacterias que componían la misma, designadas con las siglas TCB y sumaban en total 122 ejemplares. Muchas de ellas llevaban varios años congeladas en glicerol al 20 % a -80 °C, así que su viabilidad podía verse comprometida, por lo que se utilizó para la revitalización caldo cerebro-corazón enriquecido con glucosa al 20 %. Éste es un medio de cultivo enriquecido que se utiliza especialmente para crecer microorganismos que sean problemáticos en su crecimiento, o que hayan perdido las condiciones óptimas en su

conservación, ya sea por su antigüedad o por falta de mantenimiento de la temperatura. En estos casos, este medio suele ofrecer mejores resultados que otros medios generales más convencionales, como puede ser el medio LB.

De aquellos microorganismos que consiguieron ser revitalizados, se llevó a cabo una siembra en placa con LB agar para su crecimiento en césped, una inoculación en medio líquido LB, y un agotamiento de asa en placas de LB agar.

Dado el gran número de organismos revitalizados con los que se contaba, para facilitar el trabajo con ellos y en previsión a su posterior escalado para la producción enzimática, se seleccionaron aquellos que en su crecimiento cumplían los siguientes requisitos:

1-Crecimiento en medio LB tanto sólido como líquido en 24 horas a 30 °C.

2-Pureza de los cultivos, determinada a partir del agotamiento de asa en placas de LB agar y a través de observación en el microscopio de los crecimientos en LB líquido.

De todos los microorganismos seleccionados, en total 82, se crearon copias en criotubos para su conservación a -20 °C, a -80 °C y liofilizados, tal y como se describe en el apartado V.2.1.2.2.

III.1.1.1. Selección de microorganismos mesófilos productores de glicosidasas

Se realizó según el protocolo que se detalla en el apartado V.2.4.1.1 de Materiales y Métodos. La reacción de hidrólisis se llevo a cabo empleando células en condiciones de no crecimiento, es decir, cultivadas en medio líquido hasta alcanzar la fase estacionaria. La selección se basó en la búsqueda de actividades glicosidasa, para lo que se utilizó una batería de sustratos hidrolizables por estas enzimas, que, tras producirse la reacción, liberan al medio una molécula de *p*-nitrofenol (*p*NF). Los

sustratos utilizados fueron *p*-nitrofenil- α -D-fucopiranosido (*pNF- α -Fuc*), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosido (*pNF- β -Fuc*), *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (*pNF- α -Gal*), *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*pNF- β -Gal*), *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*pNF- α -Glu*), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*pNF- β -Glu*), *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido (*pNF- α -Man*), *p*-nitrofenil- β -D-manopiranosido (*pNF- β -D-Man*), *p*-nitrofenil- α -N-acetilglucosaminopiranosido (*pNF- α -GlcNAc*) y *p*-nitrofenil- β -N-acetilglucosaminopiranosido (*pNF- β -GlcNAc*). Este compuesto en disolución adquiere una coloración amarillenta que es detectable espectrofotométricamente a 405 nm. El uso de lector de microplacas facilitó la labor de medición de absorbancia, dado el gran número de microorganismos y de sustratos a estudiar. Para considerar los resultados positivos o negativos se aplicaron los siguientes criterios:

- Absorbancia entre 0 y 0,05 se consideró resultado negativo (-).
- Absorbancia entre 0,05 y 0,5 se consideró resultado positivo (+).
- Absorbancia mayor de 0,5 se consideró resultado doble positivo (++)

Los resultados se muestran en la Tabla 2, en la que solo aparecen aquellos que presentaron actividad al menos en uno de los ensayos. Como se puede observar, se obtuvieron resultados positivos y doble positivos para prácticamente todas las actividades glicosidasa ensayadas. Las únicas actividades de las que no se obtuvo ningún candidato positivo fueron la hidrólisis de *pNF- α -Fuc* y *pNF- α -GlcNAc*. El encontrar organismos que no son capaces de producir ningún tipo de actividad puede ser debido al hecho de utilizar medios de crecimiento ricos sin inducción, por lo que la producción basal de este tipo de enzimas es demasiado baja como para ser detectada. (Madigan y *col.* 2003)

Tabla 2. Resultados del screening de actividades de microorganismos productores de glicosidasas.

<i>p</i> NF-	β -Fuc	α -Fuc	β -Glu	α -Glu	β -Gal	α -Gal	β -Man	α -Man	β -GlcNAc	α -GlcNAc
TCB 4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 104	+	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 112	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-
TCB 118	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TCB 1600	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 1607	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TCB 1613	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TCB 1614	-	-	++	+	+	-	-	-	+	-
TCB 1616	-	-	++	+	+	-	-	-	+	-
TCB 1620	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TCB 1628	-	-	+	+	+	+	-	-	++	-
TCB 1638	-	-	+	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1639	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1642	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1645	+	-	++	-	+	-	+	-	-	-
TCB 165	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-
TCB 1652	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1659	-	-	+	+	++	+	+	+	++	-
TCB 1662	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 1675	-	-	+	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1689	-	-	+	+	+	+	-	+	++	-
TCB 1692	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1699	+	-	++	++	-	-	-	-	+	-
TCB 1704	++	-	++	++	+	-	-	-	++	-
TCB 1705	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1706	-	-	++	+	+	-	-	-	+	-
TCB 1707	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1715	-	-	+	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1716	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1718	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-

Resultados y Discusión

pNF-	β -Fuc	α -Fuc	β -Glu	α -Glu	β -Gal	α -Gal	β -Man	α -Man	β -GlcNAc	α -GlcNAc
TCB 1719	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1724	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1727	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1728	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 1733	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
TCB 1734	+	-	+	++	+	-	-	-	-	-
TCB 1740	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-
TCB 1742	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 190	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-
TCB 255	-	-	++	-	+	-	-	-	+	-
TCB 308	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 329	++	-	++	++	+	+	-	+	++	-
TCB 355	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 368	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 369	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 408	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
TCB 410	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
TCB 423	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TCB 427	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
TCB 432	++	-	+	+	++	-	-	-	-	-
TCB 441	-	-	-	++	-	+	-	-	++	-
TCB 448	-	-	++	+	+	+	-	+	+	-
TCB 449	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 464	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCB 468	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-
TCB 47	-	-	++	++	-	+	-	++	+	-
TCB 471	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-
TCB 472	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Al recibir la colección sin identificar, se corría el riesgo de seleccionar microorganismos productores de enzimas ya caracterizadas, poco novedosas o de poco interés. Por ello, se decidió comenzar la búsqueda de microorganismos capaces de sintetizar oligosacáridos por aquellos candidatos que presentaron actividad β -fucosidasa, los cuales aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Selección de microorganismos con actividad β -fucosidasa

Código	p-nitrofenil- β -D-fucopiranosido
TCB 104	+
TCB 1645	+
TCB 1699	+
TCB 1704	++
TCB 1734	+
TCB 1742	+
TCB 329	++
TCB 432	++
TCB 449	+
TCB 464	+

III.1.1.2. Búsqueda de actividad de transglicosidación con células enteras de organismos mesófilos

Como se explicó en la Introducción de esta memoria (apartado I.2.1), las glicosidasas, además de llevar a cabo reacciones de hidrólisis, en determinados casos también pueden utilizar el sustrato como donador para realizar reacciones de transglicosidación. Por ello, una vez elegidos los candidatos para la búsqueda, éstos se utilizaron como biocatalizadores en reacciones de transglicosidación, tal y como se explica en el apartado V.2.4.1.3, utilizando como donador pNF- β -Fuc frente a una batería de monosacáridos aceptores compuesta por D-(+)-fucosa (Fuc), D-(+)-fructosa (Fru), D-(+)-galactosa (Gal), D-(+)-glucosa (Glu), D-(+)-galactosamina (GalNH₂), D-(+)-manosa (Man), N-acetilgalactosamina (GalNAc) y N-acetilglucosamina (GlcNAc).

En ninguna de las 80 reacciones se obtuvo ningún resultado positivo para la síntesis de disacáridos. Esto demuestra por una parte que no todas las enzimas capaces de hidrolizar azúcares son capaces de realizar reacciones de transglicosidación, por otro lado, trabajar con células enteras dificulta el control estricto sobre las condiciones de reacción, ya que puede haber reacciones secundarias que inhiban la síntesis o degraden los productos. Además, al no estar identificada la colección BTG, no conocer la especie de los microorganismos con los que se han realizado las reacciones impide conocer las condiciones óptimas de crecimiento, recursos genéticos o caracterizaciones enzimáticas previas.

Por todo lo citado anteriormente se seleccionó uno de los microorganismos más activos para la hidrólisis de *PNF-β-Fuc*, el TCB 329, para ser identificado genéticamente y poner a punto las condiciones de purificación de la enzima *β-fucosidasa*. TCB 329 es, entre los doble positivos para *β-fucosidasa*, la que más actividades presenta (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados actividades hidrolíticas de TCB 329

<i>pNF-</i>	<i>β-Fuc</i>	<i>α-Fuc</i>	<i>β-Glu</i>	<i>α-Glu</i>	<i>β-Gal</i>	<i>α-Gal</i>	<i>β-Man</i>	<i>α-Man</i>	<i>β-GlcNAc</i>	<i>α-GlcNAc</i>
TCB 329	++	-	++	++	+	+	-	+	++	-

La bacteria TCB 329 se creció en medio LB líquido y su DNA fue extraído tal y como se describe en el apartado V.2.2.1. Para confirmar que la extracción fue correcta se realizó una electroforesis en gel de agarosa (apartado V.2.2.7) (Figura 12), en el que se pueden observar dos bandas. La banda 1 se corresponde con el cromosoma en conformación de círculo abierto, y la banda 2, con el cromosoma covalentemente cerrado. El DNA extraído fue enviado para su identificación a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. La identificación fue llevada a cabo mediante la secuenciación de la subunidad 16s ribosómica. La bacteria fue identificada como *Cellulomonas gelida*.

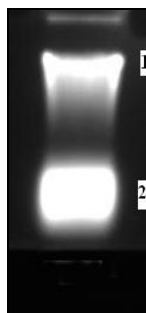


Figura 12. Gel de agarosa. Extracción de DNA. Banda 1: Cromosoma en conformación de círculo abierto. Banda 2: Cromosoma en conformación de círculo covalentemente cerrado.

C. gelida es una bacteria celulolítica que fue originalmente aislada de suelos ricos en materia vegetal. Se sabe que es capaz de utilizar como fuente de carbono los siguientes compuestos: Celulosa, almidón, D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, celobiosa, maltosa, trehalosa, sacarosa y acetato, y su genoma no está secuenciado (Stackerbrandt 2005).

III.1.1.3. Inducción de la producción de β -fucosidasa de *Cellulomonas gelida*

La enzima β -fucosidasa produce la hidrólisis de residuos de fucosa. Es frecuente que las enzimas con esta actividad también presenten actividad β -galactosidasa, y en muchos caso también β -glucosidasa, debido a fenómenos de promiscuidad de sustrato (Nord y col. 1972; Wiederschain y col. 1973; Calvo y col. 1983; Melgar y col. 1985; Den Tandt 1987; Nunoura y col. 1996; Srisomsap y col. 1996). Cabría esperar que la presencia de disacáridos en el medio de crecimiento bacteriano provoque la activación de los sistemas genéticos implicados en la fabricación de esta enzima, al igual que ocurre con el operón *lac*, que es activado por la presencia de lactosa para la síntesis de β -galactosidasa, entre otras enzimas y transportadores (Mathews y col. 2003).

Al utilizar medio LB diluido, se pretendió forzar a la bacteria a utilizar los disacáridos como fuente de carbono y así, aumentar la producción de las enzimas implicadas en el metabolismo de estos. Para ver el efecto inductor de los distintos disacáridos se procedió a realizar cultivos en presencia de un 1 % de los disacáridos celobiosa lactosa, maltosa, melibiosa y sacarosa, tal y como se muestra en el apartado V.2.1.3.1.

Llevada a cabo la producción por triplicado en presencia de los distintos disacáridos y roto las células y liofilizados los extractos (apartados V.2.1.6 y V.2.5.7 respectivamente), se midió su actividad hidrolítica tal y como se describe en el apartado V.2.4.1.2, cuyos resultados se muestran en la Figura 13. La lactosa y la sacarosa muestran una actividad muy similar a la del control no inducido. La maltosa y la melibiosa aumentan en cierta medida la producción de β -fucosidasa respecto al control (3 y 2,5 veces respectivamente), pero el resultado más notable se encuentra cuando se utiliza celobiosa (Glu-(β (1-4)-Glu) como inductor. En este caso la actividad es más de ocho veces mayor que en el control (167,9 frente a 21,1 UI).

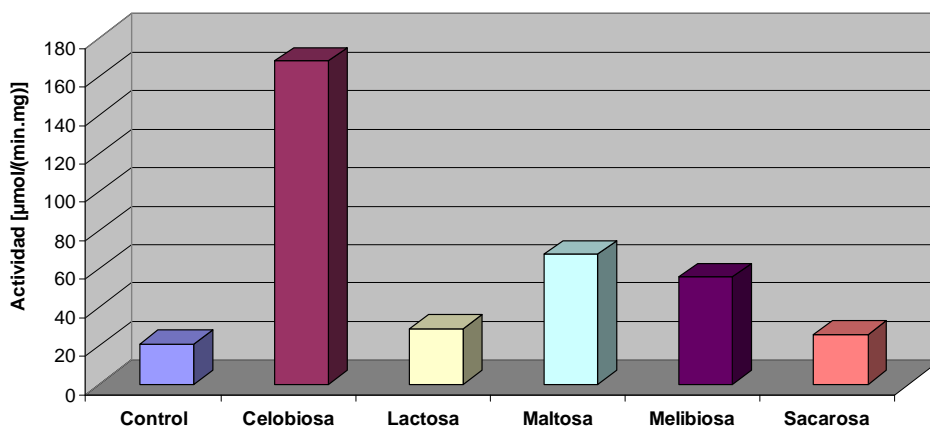


Figura 13. Actividad β -fucosidasa de *C. gelida* después de haber crecido en presencia de los inductores celobiosa lactosa, maltosa, melibiosa y sacarosa.

Hsing y Canale-Parola en 1992 descubrieron que *C. gelida* presenta quimiotaxis positiva hacia celobiosa, es decir, es capaz de detectar gradientes de celobiosa y, al ser una bacteria móvil, desplazarse hacia los puntos donde la concentración de ésta sea mayor (Hsing y col. 1992). También descubrieron que esta bacteria posee en su pared dos tipos de receptores: el Cb1, que es exclusivo de celobiosa y es inducible, y el Cb2, que es capaz de detectar tanto celobiosa como glucosa y que es constitutivo. Todo esto es compatible con el hecho de que *C. gelida* es una bacteria celulolítica y que la celobiosa es el producto mayoritario de la hidrólisis de la celulosa. Estos investigadores propusieron un modelo del mecanismo de supervivencia de esta bacteria en su medio natural. En él, determinan que las celulasas extracelulares producidas por otras bacterias hidrolizan la celulosa proveniente de restos de plantas. Esta hidrólisis genera un gradiente de concentración de celobiosa. *C. gelida* detecta este gradiente con su receptor Cb2 constitutivo, lo que hace que migre hacia el origen de la celobiosa. A su vez, se activan los sistemas para la síntesis del receptor Cb1, lo que multiplica la respuesta quimiotáctica. La llegada de más bacterias celulolíticas provoca mayor degradación de celulosa, manteniendo el gradiente de celobiosa mientras esta es consumida.

Este modelo, que demuestra que la presencia de celobiosa en el medio induce la síntesis del receptor Cb1, podría explicar por qué este disacárido aumenta considerablemente la producción de la enzima con actividad β -fucosidasa. Esto es debido a que las enzimas con actividad β -fucosidasa también presentan actividad β -galactosidasa y β -glucosidasa (Nord y col. 1972; Wiederschain y col. 1973; Calvo y col. 1983; Melgar y col. 1985; Den Tandt 1987; Nunoura y col. 1996; Srisomsap y col. 1996), la celobiosa (compuesta por dos moléculas de β -glucosa) induce la síntesis de la enzima por su actividad β -glucosidasa para la hidrólisis del disacárido. Debido a la promiscuidad de sustrato, indirectamente también aumenta la actividad β -fucosidasa ya que se trataría de la misma enzima.

III.1.1.4. Purificación de la enzima β -fucosidasa de *Cellulomonas gelida*

La β -fucosidasa de *C. gelida* es una enzima intracelular, por lo que es necesario romper las células para poder extraerla (Apartado V.2.1.6). Esto implica que la enzima va acompañada de todos los componentes intracelulares. Para poder llevar a cabo la caracterización estructural de la enzima, así como su secuenciación, es necesario purificarla.

III.1.1.4.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

El sulfato amónico aumenta la fuerza iónica del medio forzando a las proteínas a unirse por sus regiones menos hidrofílicas, formando agregados y precipitando. Dependiendo de la estructura de las diferentes proteínas presentes en el medio, el aumento gradual de concentración de la sal provoca su precipitación escalonada.

III.1.1.4.1.1 Efecto del sulfato de amonio sobre la actividad enzimática

Puesto que para determinar la fracción en la que precipita la enzima era necesario realizar una prueba de actividad (apartado V.2.4.1.2.1), antes de llevar a cabo la precipitación se midió la actividad del extracto en presencia de sulfato amónico, tal y como se explica en el apartado V.2.3.3.1.1. El resultado de este ensayo fue una pérdida total de actividad en el 20 % de concentración de este. Por ello es necesario retirar la sal de la disolución para poder determinar la fracción en la que se encuentra la enzima, para lo que se utilizaron tubos vivaspin (Sartorius) de 30 kDa.

Al no conocer el peso molecular de la enzima β -fucosidasa de *Cellulomonas gelida*, se comprobó que ésta no atraviesa la membrana de 30 kDa. Tras centrifugar una alícuota en vivaspin y hacer lavados con tampón, se comprueba que la actividad permanece en la fracción que no atraviesa la membrana, lo que concuerda con los datos bibliográficos, en los que la β -fucosidasa de menor peso molecular localizada en otro organismo es la de *Bifidobacterium breve*, de 47 kDa (Nunoura y col. 1996).

III.1.1.4.1.2 Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Al realizar la precipitación, añadiendo concentraciones crecientes de sulfato amónico (como se detalla en el apartado V.2.3.3.1.2), se localizaron fracciones positivas para actividad β -fucosidasa en todos los pasos entre el 30 y el 70% de saturación de sal. Esto se debe a que ésta es una técnica de purificación muy poco precisa, utilizada sobre todo para concentrar proteínas. Para perder la menor cantidad de enzima posible se conservó todo el intervalo de proteínas que precipitan entre 30 y 70%. Además, con una concentración del 30 % de sulfato amónico ya han precipitado la mayoría de proteínas y contaminantes no proteicos del extracto. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para observar el grado de pureza (apartado V.2.3.2.1). El rendimiento de los distintos pasos de purificación y la electroforesis se muestran agrupados en el apartado III.1.1.4.4.

III.1.1.4.2. Aislamiento por cromatografía de intercambio iónico discontinua

Tras la precipitación fraccionada con sulfato amónico se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en discontinuo. Para poner a punto las condiciones de la purificación, se utilizaron distintos tipos de sefarosa (Q, DEAE, S y CM), cuyas características se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Tipos de resinas empleadas para la purificación de la β -fucosidasa de *C. gelida*.

Intercambio	Tipo	Nombre	Carga de la resina	Carga de las moléculas retenidas	
Aniónico	Catiónicas	Q	+	-	pH>pI
		DEAE	+	-	
Catiónico	Aniónicas	S	-	+	pH<pI
		CM	-	+	

III.1.1.4.2.1 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática

Antes de realizar la purificación se comprobó que la enzima mantuviera la actividad β -fucosidasa en presencia de cloruro sódico 1 M, tal y como se describe en el apartado V.2.3.3.2.1. Los resultados indican que la actividad es similar a la encontrada cuando la reacción se produce en medios sin esta sal, por lo que no es necesario retirarla mediante tubos vivaspin cada vez que sea necesario determinar esta para localizar la fracción donde se encuentra la enzima.

III.1.1.4.2.2 Selección del tipo de resina cromatográfica

La cromatografía se realizó a pH 7, por lo que cabe esperar que esté por encima del punto isoeléctrico de las proteínas de la muestra, con lo que estarían cargadas negativamente y deberían quedar retenidas en las resinas DEAE y Q, que tienen carga positiva (**Tabla 5**). Los datos bibliográficos indican que la β -fucosidasa de *Bifidobacterium breve* y de *Helicella ericetorum* tienen un punto isoeléctrico de 4,3 (Calvo y col. 1983; Nunoura y col. 1996).

Siguiendo el protocolo del apartado V.2.3.3.2.3 se observó que a pH 7 la enzima no se une a las resinas de intercambio catiónico, S-sefarosa y CM-sefarosa, en cambio queda totalmente unida a las de intercambio aniónico, DEAE-sefarosa y Q-sefarosa. Los resultados confirman que a este pH la enzima está cargada negativamente y que eluyendo con cloruro sódico 1M se separa la totalidad de la enzima de las resinas de intercambio aniónico. Esto concuerda con los datos bibliográficos de otros organismos en los que el punto isoeléctrico de β -fucosidasa se sitúa en 4,3 (*B. breve* y *H. ericetorum*) (Calvo y col. 1983; Nunoura y col. 1996), con lo que también serían eluidos en estas condiciones. Se utilizará Q-sefarosa y DEAE-sefarosa para llevar a cabo la purificación de la enzima.

III.1.1.4.2.3 Cromatografía en Q-sefarosa y DEAE-sefarosa

En la purificación en discontinuo, las concentraciones crecientes de cloruro sódico se añaden escalonadamente. La resina con las proteínas retenidas se pone en contacto con una solución tampón con una concentración de cloruro sódico determinada, se eluye y se pone en contacto con una solución tampón con una concentración de sal mayor y así sucesivamente, para que las proteínas unidas se vayan liberando de la resina a cada paso según su punto isoeléctrico.

Para localizar la concentración de cloruro sódico a la que se eluye la enzima se realizó un primer acercamiento con las siguientes concentraciones de sal: 0,2, 0,4, 0,6, y 0,8 M. (

Figura 14). Como se puede observar, con ambas resinas la enzima es eluida mayoritariamente cuando se utiliza una concentración de 0,4 M de cloruro sódico.

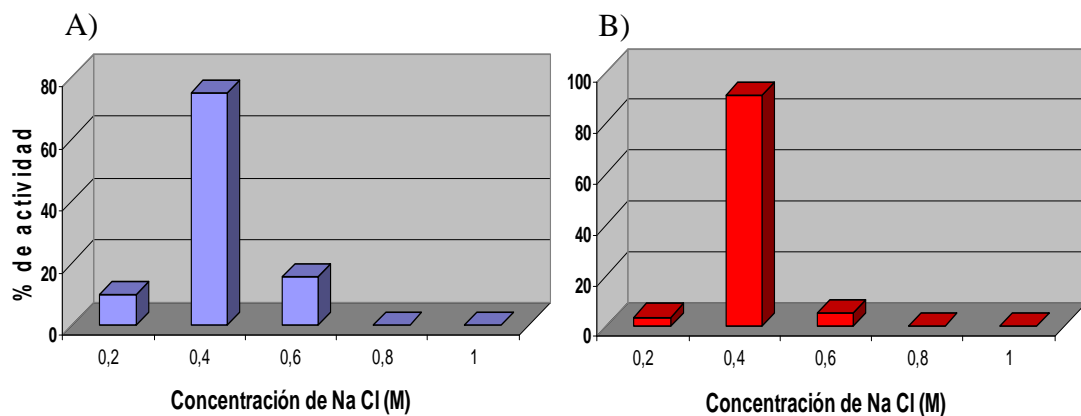


Figura 14. Resultados de la elución de la β -fucosidasa de *C. Gelida* en A) DEAE-sefarosa y B) Q-sefarosa, en función de la concentración de NaCl entre 0,2 y 1 M.

Para conocer de forma más exacta a qué concentración entre 0,2 y 0,4 M de cloruro sódico se producía su elución, se repitió el experimento eluyendo a 0,2 0,25, 0,3, 0,35 y 0,4 M (

Figura 15). Los resultados indican que la elución de la enzima de la resina ocurre de forma gradual, dividida en todos los intervalos de concentración, siendo máxima en 0,3 M.

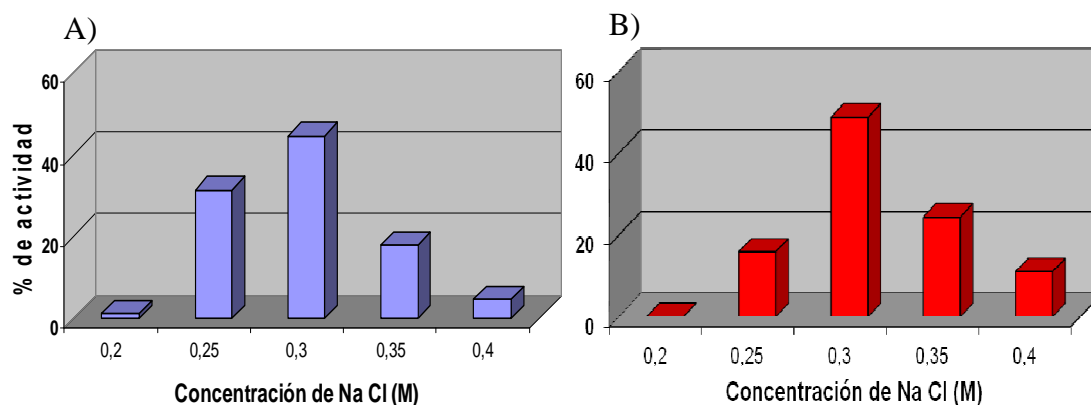


Figura 15. Resultados de la elución de la β -fucosidasa de *C. Gelida* en **A)** DEAE-sefarosa y **B)** Q-sefarosa en función de la concentración de NaCl en el intervalo 0,2 y 0,4 M

Con el doble objetivo de perder la menor cantidad posible de la enzima, pero a su vez lograr una purificación efectiva, se decidió establecer como protocolo de purificación la cromatografía en DEAE-sefarosa y recoger las proteínas eluidas entre 0,2 y 0,3 M. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para observar el grado de pureza (apartado V.2.3.2.1). El rendimiento de los distintos pasos de purificación y la electroforesis se muestran agrupados en el apartado III.1.1.4.4.

III.1.1.4.3. Cromatografía de exclusión molecular

Una vez establecidas las condiciones de purificación por precipitación con sulfato amónico y por cromatografía de intercambio aniónico en discontinuo, se procedió a realizar una cromatografía de exclusión molecular. Este sistema de purificación se basa en la separación de las proteínas de la muestra según su tamaño y volumen en solución. Como fase estacionaria se utilizó Sephadex G-150 superfino, que separa moléculas de una masa comprendida entre 5 y 150 kDa. Se seleccionó este gel con una intervalo de separación tan amplio debido a que se desconoce el peso molecular de la β -fucosidasa de *C. gelida*, así como si se trata de una enzima monomérica, multimérica, o que forma agregados.

Las fracciones con actividad β -fucosidasa procedentes de la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-sepharose se reunieron en una sola muestra, que tras concentrar en vivaspin (Sartorius), se aplicó en una columna de Sephadex G-150 superfino equilibrado en tampón fosfato 30 mM, pH 7. A continuación, el mismo tampón fue utilizado como fase móvil. Las fracciones eluidas se recogieron y se determinó su absorbancia a 280 nm, así como su actividad frente a p NF- β -Fuc (detallado en el apartado V.2.3.3.3). El perfil de elución obtenido se representa en la Figura 16. Como se puede observar, el pico de actividad β -fucosidasa se encuentra desplazado del pico de absorción a 280 nm, y se sitúa entre las fracciones 10 y 15, siendo máximo en las fracciones 12 y 13. Esta última, la fracción 13 fue seleccionada para estudios posteriores. La mayor concentración de proteínas (medidas a 280 nm) se sitúa en la fracción 10. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para observar el grado de pureza (apartado V.2.3.2.1). El rendimiento de los distintos pasos de purificación y la electroforesis se muestran agrupados en el apartado III.1.1.4.4.

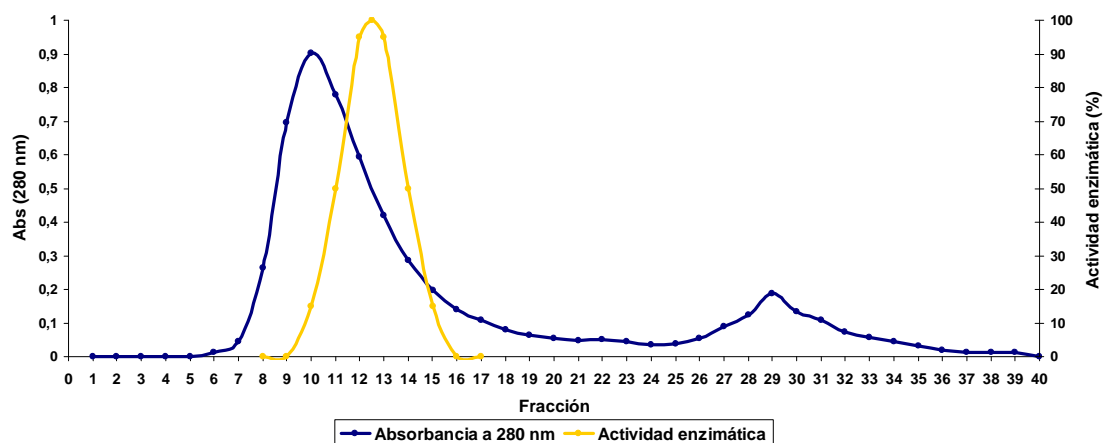


Figura 16. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular

III.1.1.4.4. Rendimiento de las etapas de purificación

El seguimiento del proceso de purificación de la actividad β -fucosidasa de *C. gelida* en cada etapa se resume en la Tabla 6. El grado de purificación de cada etapa se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para observar el grado de pureza (apartado V.2.3.2.1).

Tabla 6. Seguimiento del proceso de purificación de la actividad β -fucosidasa de *C. gelida*

Etapa de purificación	Actividad Total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Concentración de Proteínas (mg/ml)	Actividad Específica [$\mu\text{mol}/(\text{min}.\text{mg})$]	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Extracto inicial	64500,45	11,23	15,90	100	-
Precipitación Fraccionada	50973,38	8,87	37,26	79,0	2,7
Cromatografía de Intercambio Iónico	40449,54	7,04	61,59	62,7	4,5
Cromatografía de Exclusión Molecular	22195,05	3,86	309,63	34,4	23,8

Respecto al extracto inicial, el proceso completo de purificación ha tenido un rendimiento del 34,4 % y un factor de purificación de 23,8 veces. Se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE para observar el grado de purificación (apartado V.2.3.2.1).

Para poder visualizar el grado de pureza alcanzado en cada paso de purificación, se corrió un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (apartado V.2.3.2.1). En los carriles se cargaron alícuotas de la precipitación fraccionada con sulfato amónico (apartado III.1.1.4.1), la purificación por intercambio iónico en discontinuo (apartado III.1.1.4.2) y las fracciones 10, 11, 12 y 13 de la cromatografía de exclusión molecular (apartado III.1.1.4.3) (Figura 17).

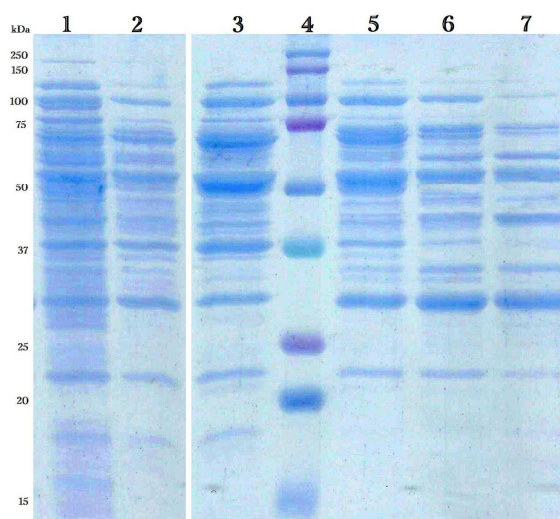


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE de las distintas etapas de purificación de la enzima con actividad β -fucosidasa. Carriles: 1 -> Precipitación con sulfato amónico. 2 -> Cromatografía de intercambio aniónico. 3->Fracción 10 de la cromatografía de exclusión molecular. 4-> Proteínas patrón preteñidas. 5, 6 y 7 -> Fracciones 11, 12 y 13 respectivamente de la cromatografía de exclusión molecular.

Se puede observar que tras cada paso de la purificación se van obteniendo menos bandas y las bandas predominantes se observan más concentradas, aunque no se ha logrado una purificación total. Al no conocer el peso molecular de la β -fucosidasa de *C. gelida*, no se puede saber qué banda o bandas corresponden a la enzima.

III.1.1.4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

La electroforesis nativa no ofrece datos concretos sobre peso molecular, ya que debido a que las proteínas mantienen su estructura nativa, el avance se ve afectado por su carga neta, forma y número de subunidades, entre otros factores. Se llevó a cabo esta electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % para poder hacer uso del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-fucopiranosido (Fuc- β -MU) y localizar la banda en la que se encuentra la enzima. Este sustrato, al ser hidrolizado, libera la molécula de 4-metil-umberiferona, que emite fluorescencia cuando se expone a luz UV. Puesto que se debe producir la reacción de hidrólisis de este sustrato para poder localizar la

banda, es importante que en todo el proceso de purificación y en la propia electroforesis la enzima mantenga su actividad. Para llevar a cabo la electroforesis se siguió el protocolo expuesto en el apartado V.2.3.2.2, y el revelado con el sustrato de Fuc- β -MU según el apartado V.2.3.3.4 (Figura 18). Como se puede observar, con este procedimiento se puede localizar con claridad la banda que corresponde con la enzima.

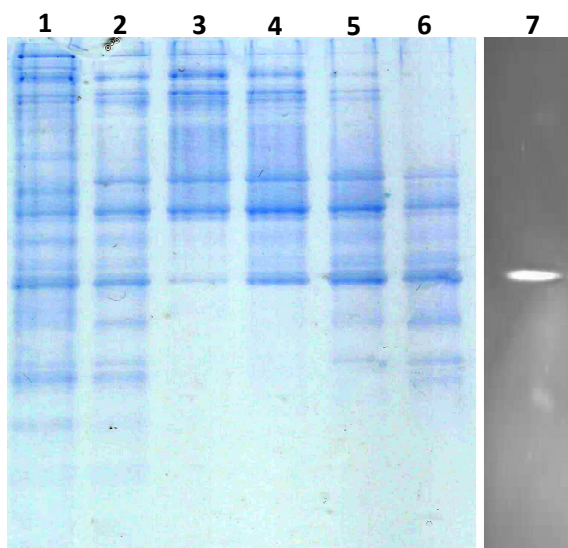


Figura 18. Electroforesis en condiciones nativas de las distintas etapas de purificación de la enzima con actividad β -fucosidasa. Carriles: 1. Precipitación con sulfato amónico. 2. Cromatografía de intercambio aniónico. 3, 4, 5 y 6. Fracciones 10, 11, 12 y 13 respectivamente de la cromatografía de exclusión molecular. 7. Carril con fracción 13 de la cromatografía de exclusión molecular, cortado del gel, incubado con Fuc- β -MU y revelado con luz UV.

Para poder profundizar en la caracterización estructural de la enzima y su actividad, se debe conseguir un grado de pureza homogéneo. Para ello, es necesario utilizar otro tipo de procedimientos cromatográficos, como cromatografía de hidrofobicidad, o mejorar los protocolos aquí expuestos, como por ejemplo, llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefarosa en columna y en gradiente continuo de cloruro sódico, para así conseguir una mayor resolución. Otra opción puede ser realizar esta cromatografía, en lugar de a pH 7, en el que todas las

proteínas estarán cargadas negativamente, a uno más bajo, como puede ser pH 5, para aumentar las diferencias de afinidad por punto isoelectrico. Obtenido este grado de pureza de la enzima β -fucosidasa de *C. gelida*, se utilizó la fracción 13 de la cromatografía de exclusión molecular para llevar a cabo la búsqueda de actividad de transglicosidación

III.1.1.5. Búsqueda de actividad de transglicosidación con β -fucosidasa semipurificada de *C. gelida*

Se llevaron a cabo reacciones de transglicosidación con la enzima β -fucosidasa obtenida en la fracción 13 de la cromatografía de exclusión molecular (apartado III.1.1.4.3). Las reacciones se realizaron como se describe en el apartado V.2.4.2.2, utilizando como donador pNF- β -fuc y como aceptores una batería de monosacáridos compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlucNAc. No se produjo síntesis de disacáridos en ninguna de las reacciones ensayadas.

Se ha obtenido por primera vez una enzima con actividad β -fucosidasa de la bacteria *C. gelida*. Esta enzima, a pesar de no presentar actividad de transglicosidación, muestra una elevada actividad hidrolítica, lo que evidencia su gran potencial para ser utilizada en procesos de hidrólisis de β -fucósidos.

III.1.2. Búsqueda de termozimas con actividad glicosidasa y glicosiltransferasa

La segunda parte de este capítulo consiste en la búsqueda de enzimas termófilas (termozimas) de tipo glicosidasa y glicosiltransferasa en la cepa PRQ25 de *Thermus thermophilus*. Primero se llevó a cabo un screening de actividad hidrolítica con las células enteras de este microorganismo. Después se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma de la bacteria para localizar las secuencias que transcriben para los genes de posibles enzimas con actividad glicosidasa y glicosiltransferasa, para su posterior clonaje en *E. coli* y caracterización.

III.1.2.1. Búsqueda de actividades glicosidasa con células enteras de *T. thermophilus* PRQ25

Se realizó un cribado en presencia de una batería de monosacáridos activados con una molécula de *pNF* según las condiciones del apartado V.2.4.1.1. Los sustratos utilizados fueron *pNF- α -Fuc*, *pNF- β -Fuc*, *pNF- α -Gal*, *pNF- β -Gal*, *pNF- α -Glu*, *pNF- β -Glu*, *pNF- α -Man*, *pNF- β -D-Man*, *pNF- α -GlcNAc* y *pNF- β -GlcNAc*. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo empleando células en condiciones de no crecimiento, es decir, cultivadas en medio líquido hasta alcanzar la fase estacionaria. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Para considerar los resultados positivos o negativos se aplicaron los siguientes criterios:

- Absorbancia entre 0 y 0,05 se consideró resultado negativo (-).
- Absorbancia entre 0,05 y 0,5 se consideró resultado positivo (+).
- Absorbancia mayor de 0,5 se consideró resultado doble positivo (++)

Como se puede observar, las células enteras de *T. thermophilus* PRQ25 son capaces de hidrolizar *pNF- α -Glu* y *pNF- α -Man*.

Tabla 7. Resultados del screening de actividades glicosidasa en *T. thermophilus* PRQ25.

<i>p</i> NF-	β -Fuc	α -Fuc	β -Glu	α -Glu	β -Gal	α -Gal	β -Man	α -Man	β -GlcNAc	α -GlcNAc
TtPRQ25	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-

III.1.2.2. Búsqueda de actividades de transglicosidación con células enteras de *T. thermophilus* PRQ25

Una vez descubiertos los sustratos para los que la cepa PRQ25 es activa hidrolíticamente (*p*NF- α -Glu y *p*NF- α -Man), se procedió a usarlos como donadores para comprobar si estas bacterias son capaces sintetizar disacáridos mediante reacciones de transglicosidación. Se llevó a cabo el screening tal y como se explica en el apartado V.2.4.1.3 frente a una batería de monosacáridos aceptores compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Reacciones de transglicosidación con células enteras de *T. thermophilus* PRQ25 y *p*NF- α -Glu o *p*NF- α -Man como donadores frente a una batería de monosacáridos aceptores compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc.

	Fuc	Fru	Gal	Glu	GalNH ₂	Man	GalNAc	GlcNAc
<i>p</i> NF- α -Glu	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>p</i> NF- α -Man	-	-	-	-	-	+	-	-

Las células enteras de *T. thermophilus* PRQ25 presentan actividad de transglicosidación cuando se utiliza *p*NF- α -Glu como donador y Fru o Glu como aceptor, y cuando se utiliza *p*NF- α -Man como donador y Man como aceptor. En el año 2005, Silva y *col.* observaron que *T. thermophilus* presenta en su superficie transportadores específicos para sacarosa (Glu- α -(1-2)- β -Fru), isomaltulosa (Glu- α -(1-6)-Fru), maltosa (Glu- α -(1-4)-Glu) y trehalosa (Glu- α -(1-1)- α -Glu), además no reconocen Gal y Fru (Silva y *col.* 2005), lo que se corresponde con los resultados obtenidos.

III.1.2.3. Búsqueda de potenciales glicosidasas y glicosiltransferasas en el genoma *T. thermophilus* PRQ25

Puesto que el genoma de *T. thermophilus* PRQ25 ha sido secuenciado y anotado en el laboratorio del Dr. Berenguer (Alvarez y col. 2011), se llevó a cabo un rastreo bioinformático en busca de marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés Open Reading Frames) que pudieran presentar similitud de secuencia con enzimas de tipo glicosidasa. Se encontraron 6 ORFs codificantes para proteínas con potencial actividad glicolítica y glicosiltransferasa, utilizando para ello la anotación realizada por los autores de la secuenciación y el programa BLAST del Instituto Bioinformático Suizo, para comparar las secuencias encontradas con otras ya conocidas y caracterizadas (Tabla 9). Para poder predecir las características estructurales de las proteínas codificadas por esos genes se utilizaron las herramientas bioinformáticas del apartado V.2.8.1.

Tabla 9. Genes seleccionados en el genoma de *T. Thermophilus* PRQ25 con posible codificación para enzimas de tipo glicosidasa o glicosiltransferasa

Gen	Hipotética función	
PRQ25_0443	Trehalasa	Glicosidasas
PRQ25_0794	α -manosidasa	
PRQ25_2319	Amilopululanasa	
PRQ25_0528	α -glucosiltransferasa	Glicosiltransferasas
PRQ25_1525	Manosiltransferasa	
PRQ25_1926	Glicógeno sintasa	

Para el clonaje se utilizaron los vectores pET22b(+) y pET28b(+) (apartado V.1.2). Con el primero se clonan las proteínas en su forma nativa, mientras que el segundo, introduce una cola de histidinas en su extremo *N*-terminal, lo que facilita su purificación. Se analizaron las secuencias mediante el software bioinformático Vector NTI (apartado V.2.8.1) y seleccionaron las enzimas de restricción *Nde*I y *Eco*RI para clonar los genes, ya que estas no se encuentran en el interior de las secuencias y sí en la región de clonaje de los vectores. En caso de seleccionar una enzima de restricción cuya diana se encontrara dentro de la secuencia, esta sería

cortada en el proceso de digestión, provocando que el gen quedara truncado. Se diseñaron oligos para la amplificación de cada una de las secuencias incluyendo la diana de NdeI en el oligo FW y la de EcoRI en el oligo RV, para que al amplificar, fueran introducidas en los extremos 5' y 3' respectivamente, y estos fueran cohesivos con los de los plásmidos empleados (**Tabla 30** en apartado V.1.3).

Para obtener el DNA molde para las distintas PCRs se creció *T. thermophilus* PRQ25 y se extrajo su DNA total, tal y como se describe en el apartado V.2.2.1.

III.1.2.4. Amplificación de secuencias de genes de *T. thermophilus* PRQ25

A continuación se detallan las condiciones de PCR finales con las que fue posible la amplificación de cada uno de los genes de *T. thermophilus* PRQ25.

III.1.2.4.1. Genes de posibles glicosidasas de *T. thermophilus* PRQ25

Gen PRQ25_0443

Este gen, de 1263 pb, codificaba para una hipotética trehalasa (EC3.2.1.28). Estas enzimas son glicosil hidrolasas que hidrolizan trehalosa, liberando dos moléculas de glucosa (Kalf y col. 1958). El gen codificaba para una proteína de 420 aminoácidos y 49 kDa, que no incluía péptido señal, se predecía como una proteína soluble y no presentaba dominios transmembrana.

El gen fue amplificado utilizando los oligos PRQ25_0443FW y PRQ25_0443RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 19). Las condiciones finales de PCR se detallan en la Tabla 10. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

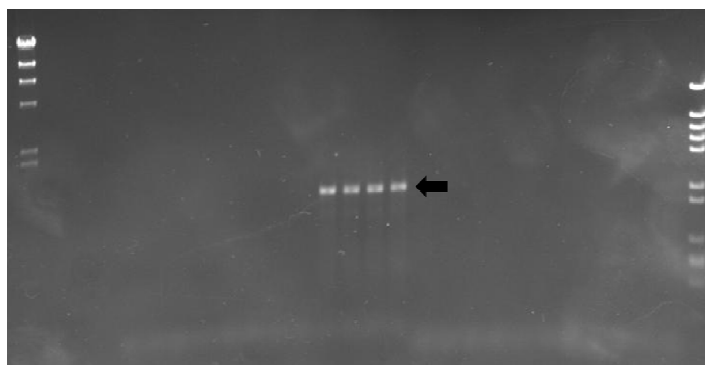


Figura 19. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_0443. En los carriles de los extremos se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 10. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_0443

Ciclo 1: (1x)	Componente	Concentración final
- 96 °C 5 min	Tampón Tth 10X	10 % (v/v)
Ciclo 2: (5x)	Tth polimerasa	0,75 µl
- 94 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,5 µl
- Gradiente de 43 a 50 °C 1 min	dNTPs	1,25 mM (cada uno)
- 69 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
- 72 °C 10 min	MgCl ₂	2 mM
Ciclo 4: (25x)	DMSO	8 % (v/v)
- 94 °C 1 min	mqH ₂ O	hasta 50 µl
- 50 °C 1 min		
- 72 °C 1,40 min		
Ciclo 5: (1x)		
- 72 °C 10 min		
Ciclo : (1x)		
- 4 °C ∞ min		

Gen PRQ25_0794

Este gen, de 1563 pb, codificaba para una hipotética α -manosidasa (EC3.2.1.24). Se trataba de una proteína de 520 aminoácidos y 59 kDa, que no incluía péptido señal, se predecía como una proteína soluble y no presentaba dominios transmembrana.

El gen fue amplificado utilizando los oligos PRQ25_0794FW y PRQ25_0794RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 20). Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 11. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

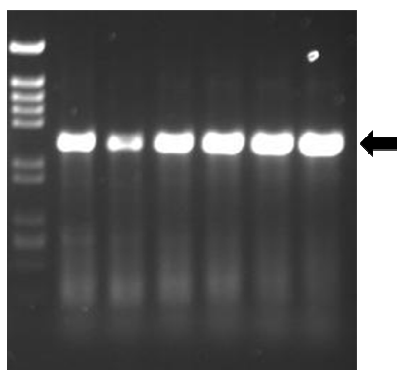


Figura 20. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_0794. En el carril del extremo izquierdo se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 11. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_0794

Ciclo 1: (1x)	Componente	Concentración final
- 96 °C 5 min	Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Ciclo 2: (30x)	Tth polimerasa	0,75.µl
- 94 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,25.µl
- Gradiente de 45 a 60 °C 1 min	dNTPs	1,25 mM (cada uno)
- 72 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
- 72 °C 10 min	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
Ciclo 4: (1x)	MgCl ₂	2 mM
- 4 °C ∞ min	DMSO	8 % (v/v)
	mqH ₂ O	hasta 50 µl

Gen PRQ25_2319

Este gen, de 2796 pb, codificaba para una amilopululanasa (EC2.4.1.11). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces $\alpha(1-6)$ que unen las unidades de maltotriosa del pululano y amilopectina. Es una proteína de 976 aminoácidos y 110 kDa, no incluía péptido señal, pero en su secuencia, las herramientas bioinformáticas predijeron la presencia de una α -hélice transmembrana de 22 aminoácidos en el extremo *N*-terminal de la proteína (Figura 21). Esto sería compatible con la posible función de la proteína, ya que el pululano es un polímero demasiado grande como para entrar en la célula, así que debe ser degradado en el periplasma de la misma o incluso en el exterior (Prajapati y *col.* 2013).

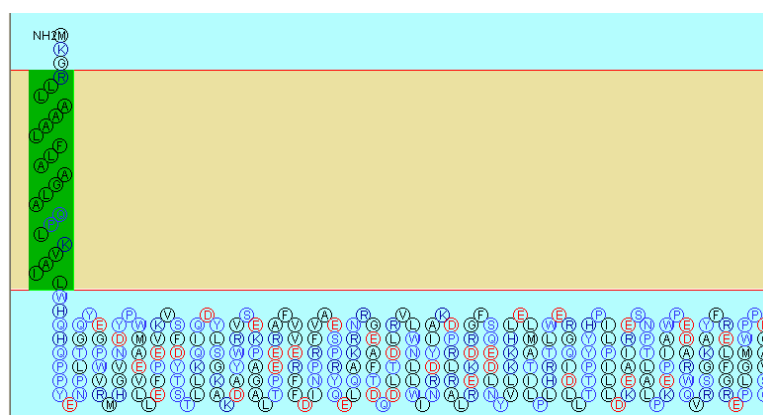


Figura 21. Representación de la región transmembrana predicha para la proteína PRQ25_2319

Para poder obtener una proteína soluble y evitar los problemas de plegamiento que podían derivarse de clonar una proteína con un dominio transmembrana, se diseñaron oligos para amplificar el gen justo por delante de esta región. La nueva predicción bioinformática dio como resultando una proteína soluble. Para conseguir esto, se utilizaron los oligos PRQ25_2319FW y PRQ25_2319RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 22). Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 12. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

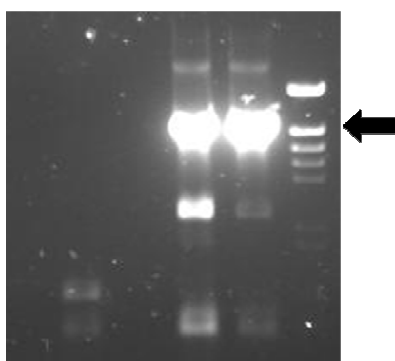


Figura 22. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_2319. En el carril del extremo derecho se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 12. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_2319

	Componente	Concentración final
Ciclo 1: (1x)		
- 96 °C 5 min	Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Ciclo 2: (5x)	Tth polimerasa	0,75.µl
- 94 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,25.µl
- Gradiente de 45 a 60 °C 1 min	dNTPs	1,25 mM (cada uno)
- 69 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
- 72 °C 10 min	MgCl ₂	2 mM
Ciclo 4: (25x)	DMSO	4 % (v/v)
- 94 °C 1 min	mqH ₂ O	hasta 50 µl
- 60 °C 1 min		
- 72 °C 1,40 min		
Ciclo 5: (1x)		
- 72 °C 10 min		
Ciclo : (1x)		
- 4 °C ∞ min		

III.1.2.4.2. Genes de posibles glicosiltransferasas de *T. thermophilus* PRQ25

Gen PRQ25_0528

Este gen, de 2898 pb, codificaba para una hipotética α -glucosiltransferasa (EC2.4.1). La proteína tiene 965 aminoácidos y 110 kDa, no incluía péptido señal, se predecía como una proteína soluble y no presentaba dominios transmembrana.

El gen fue amplificado utilizando los oligos PRQ25_0528FW y PRQ25_0528RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 23). Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 13. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

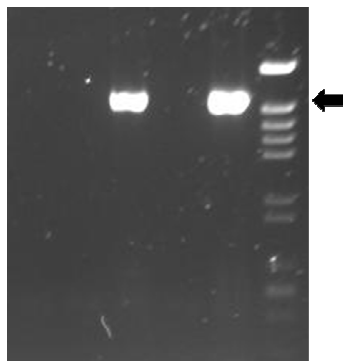


Figura 23. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_0528. En el carril del extremo derecho se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 13. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_0528

Ciclo 1: (1x)	Componente	Concentración final
- 96 °C 5 min	Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Ciclo 2: (5x)	Tth polimerasa	0,75.µl
- 94 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,25.µl
- Gradiente de 45 a 60 °C 1 min	dNTPs	1,25 mM (cada uno)
- 69 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
- 72 °C 10 min	MgCl ₂	2 mM
Ciclo 4: (25x)	DMSO	8 % (v/v)
- 94 °C 1 min	mqH ₂ O	hasta 50 µl
- 60 °C 1 min		
- 72 °C 1,40 min		
Ciclo 5: (1x)		
- 72 °C 10 min		
Ciclo : (1x)		
- 4 °C ∞ min		

Gen PRQ25_1525

Este gen, de 1023 pb, codifica para una hipotética manosiltransferasa (EC2.4.1). Es una proteína de 340 aminoácidos y 37 kDa, que no incluía péptido señal, se predecía como una proteína soluble y no presentaba dominios transmembrana.

El gen fue amplificado utilizando los oligos PRQ25_1525FW y PRQ25_1525RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 24). Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 14. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

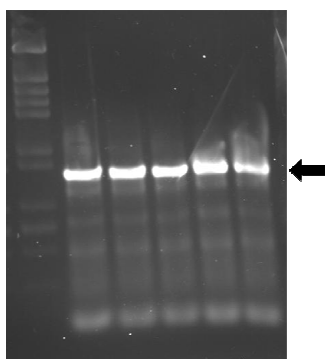


Figura 24. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_1525. En el carril del extremo izquierdo se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 14. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_0794

Ciclo 1: (1x)																							
- 96 °C 5 min																							
Ciclo 2: (10x)																							
- 94 °C 1 min																							
- Gradiente de 45 a 55 °C 1 min																							
- 72 °C 3 min																							
Ciclo 3: (1x)																							
- 72 °C 10 min																							
Ciclo 4: (20x)																							
- 94 °C 1 min																							
- 55 °C 1 min																							
- 72 °C 1,40 min																							
Ciclo 5: (1x)																							
- 72 °C 10 min																							
Ciclo : (1x)																							
- 4 °C ∞ min																							
	<table> <tr> <th>Componente</th><th>Concentración final</th></tr> <tr> <td>Tampón Tth 10X</td><td>10% (v/v)</td></tr> <tr> <td>Tth polimerasa</td><td>0,75.µl</td></tr> <tr> <td>Pfu polimerasa</td><td>0,25.µl</td></tr> <tr> <td>dNTPs</td><td>1,25 mM (cada uno)</td></tr> <tr> <td>Oligonucleótido FW</td><td>0,5 mM</td></tr> <tr> <td>Oligonucleótido Rv</td><td>0,5 mM</td></tr> <tr> <td>DNA molde</td><td>1 ng.µl⁻¹</td></tr> <tr> <td>MgCl₂</td><td>2 mM</td></tr> <tr> <td>DMSO</td><td>2 % (v/v)</td></tr> <tr> <td>mqH₂O</td><td>hasta 50 µl</td></tr> </table>	Componente	Concentración final	Tampón Tth 10X	10% (v/v)	Tth polimerasa	0,75.µl	Pfu polimerasa	0,25.µl	dNTPs	1,25 mM (cada uno)	Oligonucleótido FW	0,5 mM	Oligonucleótido Rv	0,5 mM	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹	MgCl ₂	2 mM	DMSO	2 % (v/v)	mqH ₂ O	hasta 50 µl
Componente	Concentración final																						
Tampón Tth 10X	10% (v/v)																						
Tth polimerasa	0,75.µl																						
Pfu polimerasa	0,25.µl																						
dNTPs	1,25 mM (cada uno)																						
Oligonucleótido FW	0,5 mM																						
Oligonucleótido Rv	0,5 mM																						
DNA molde	1 ng.µl ⁻¹																						
MgCl ₂	2 mM																						
DMSO	2 % (v/v)																						
mqH ₂ O	hasta 50 µl																						

Gen PRQ25_1926

Este gen, de 1323 pb, codifica para una glicógeno sintasa (EC2.4.1.11). Estas enzimas son de tipo glicosiltransferasa y catalizan la transferencia del monosacárido de una UDP-glucosa a otra glucosa aceptora, quedando en configuración $\alpha(1-4)$. Es una proteína de 440 aminoácidos y 49 kDa, que no incluía péptido señal, se predecía como una proteína soluble y no presentaba dominios transmembrana.

El gen fue amplificado utilizando los oligos PRQ25_1926FW y PRQ25_1926RV (apartado V.2.2.3), que además, introdujeron en los extremos de la secuencia de DNA dianas para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI respectivamente. Se probaron distintas condiciones de PCR hasta que se consiguió obtener una banda del tamaño esperado en gel de agarosa (Figura 25). Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 15. La banda de tamaño deseado se cortó del gel y fue purificada como se detalla en el apartado V.2.2.7.

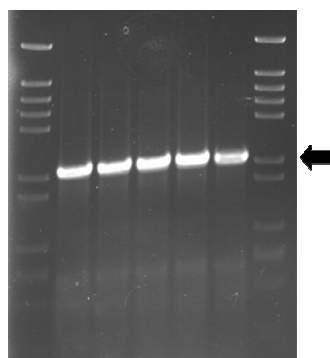


Figura 25. Gel de agarosa que muestra el resultado de la PCR en la que se han obtenido bandas del tamaño esperado para el gen PRQ25_1926. En el carril del extremo izquierdo se localizan los marcadores de peso molecular.

Tabla 15. Condiciones de PCR para la amplificación del gen PRQ25_1926

Ciclo 1: (1x)	Componente	Concentración final
- 96 °C 4 min	Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Ciclo 2: (30x)	Tth polimerasa	0,75.µl
- 94 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,25.µl
- 55 °C 1 min	dNTPs	0,5 mM (cada uno)
- 72 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
- 72 °C 10 min	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
Ciclo 4: (1x)	MgCl ₂	2 mM
- 4 °C ∞ min	DMSO	0 % (v/v)
	mqH ₂ O	hasta 50 µl

III.1.2.5. Producción de termozimas de *T. thermophilus* PRQ25

Una vez obtenidas todas las secuencias de DNA purificadas se procedió a la digestión de éstas con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI, y posterior ligación de las secuencias digeridas con los plásmidos pET28b(+) y pET22b(+), tal y como se describe en el apartado V.2.2.4. Con la mezcla de ligación se transformaron células

de *E. Coli* DH5 α por choque térmico, tal y como se describe en el apartado V.2.1.4. De las colonias crecidas (Figura 26) se realizó una digestión con NdeI y EcoRI y se corrió un gel de agarosa para detectar bandas del tamaño deseado y del plásmido. Además de cada placa se seleccionaron 3 colonias que fueron secuenciadas (apartado V.2.2.6). De esta forma se confirmó que todas las secuencias habían sido clonadas correctamente.

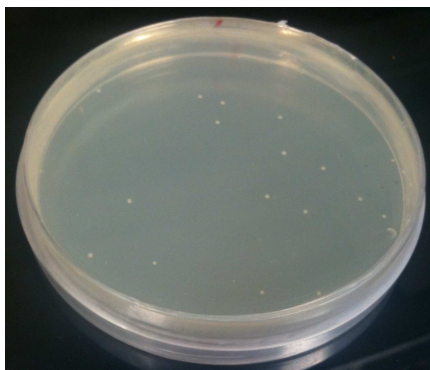


Figura 26. Colonias de *E.coli* DH5 α con el gen PRQ25_0443 clonado en el plásmido pET28b(+), crecidas en medio LB con kanamicina.

Una vez confirmado que todas las construcciones eran correctas, se utilizaron los plásmidos recombinantes obtenidos para transformar células de *E. coli* BL21 (DE-3) (apartado V.2.1.4). Se procedió a la expresión de las mismas añadiendo IPTG, según el protocolo del apartado V.2.1.5. Finalizada la producción, de las proteínas se corrió un gel de acrilamida para evaluar los niveles de expresión (Figura 27) (apartado V.2.3.2.1). Como se puede observar en la figura, ninguna de las proteínas de PRQ25 fueron expresadas en estas condiciones de crecimiento, solo aparecen las bandas típicas del crecimiento de *E. coli*. Para solventar esta situación se realizaron pruebas de inducción cambiando los tiempos de exposición al IPTG (4, 12 y 24 horas) y cambiando las temperaturas de expresión (25, 30 y 37 °C) sin obtener mejores resultados.

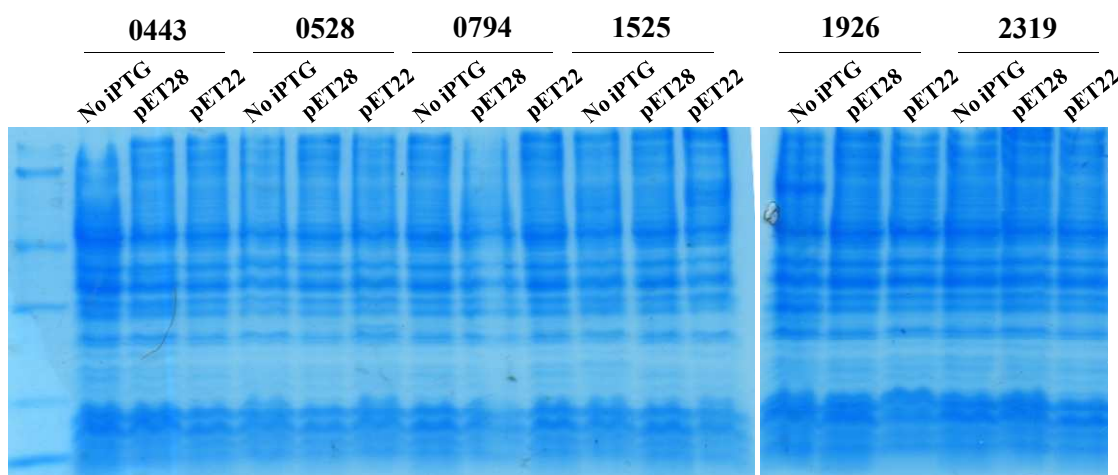


Figura 27. Prueba de expresión de los genes de *T. thermophilus* PRQ25 clonados en *E. Coli* BL21 (DE3)

La falta de expresión de estos genes en *E. coli* BL21 (DE3) se atribuye al hecho de haber llevado a cabo una recombinación heteróloga entre un organismo termófilo y un organismo mesófilo. Las distintas temperaturas a las que se producen los plegamientos de las proteínas en cada una de estas dos especies puede implicar que en *E. coli*, las proteínas resultantes no plieguen correctamente, no sean solubles y se acumulen como cuerpos de inclusión. Para conseguir expresar adecuadamente las proteínas de *T. thermophilus* PRQ25 se decidió dejar de usar *E. coli* BL21 (DE3) para usar *E. coli* Rosetta-Gami2.

La cepa Rosetta-Gami2 de *E. coli* se utiliza para la expresión heteróloga de proteínas que dan problemas en otras cepas (como BL21). Está modificada para favorecer la formación de puentes disulfuro en el citoplasma y además, lleva un segundo plásmido que codifica para la formación de 7 tipos “raros” de tRNA que no se encuentran en bacterias mesófilas como *E. coli*.

La transformación se llevó a cabo por electroporación (apartado V.2.1.4.2). Para la selección de estas células al crecer, además del antibiótico específico de cada plásmido (kanamicina para pET28b(+) y ampicilina para pET22b(+)), se debe añadir

cloranfenicol, ya que es la resistencia incluida en el segundo plásmido. Una vez crecidas las colonias, se realizaron pruebas de expresión (apartado V.2.1.5), consiguiéndose buenos resultados a 30 °C y 18 horas (Figura 28) (condiciones de electroforesis en el apartado V.2.3.2.1)

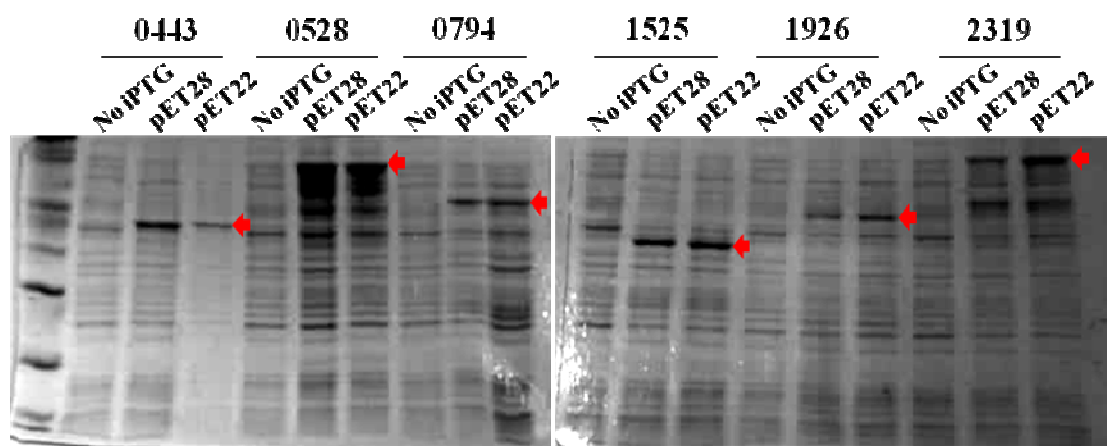


Figura 28. Prueba de expresión de los genes de *T. thermophilus* PRQ25 clonados en *E. Coli* Rosetta-Gami2

La Figura 28 muestra cómo en todos los casos se consiguieron bandas de proteínas del tamaño esperado para los genes clonados de *T. Thermophilus* PRQ25. El éxito de este experimento puso de manifiesto la importancia de utilizar un hospedador adecuado para transferir material genético. Para transformaciones heterólogas, como es el caso, la cepa Rosetta-Gami2 de *E.coli* ofreció mejores que la BL21 (DE3), a pesar de requerir una metodología más complicada, cómo es la electroporación, o el uso de dos antibióticos para mantener sus dos plásmidos.

Una vez lograda la expresión de las proteínas clonadas de *T. thermophilus* PRQ25 se llevó a cabo la producción (apartado V.2.1.5) y purificación por cromatografía de afinidad (apartado V.2.3.4) de las seis enzimas obtenidas en pET28b(+) con cola de histidinas en el extremo *N*-terminal (a las que se denominó -NTag). Las seis enzimas clonadas en pET22b(+), que no tenían un sistema de purificación como son las colas

de histidina, fueron sometidas a rotura celular (apartado V.2.1.6) y concentración en tubos vivaspin (Sartorius).

III.1.2.6. Caracterización de actividades de termozimas de *T. thermophilus* PRQ25

Como se explicó anteriormente, se han localizado en el genoma, amplificado y clonado los genes de 6 hipotéticas enzimas de *T. thermophilus* PRQ25: 3 glicosidasas y 3 glicosiltransferesas. Como esta asignación se basa en la predicción por comparación de las secuencias hecha por los autores de la secuenciación del genoma (Alvarez y col. 2011), a la hora de llevar a cabo la búsqueda de actividades, se usaron las seis enzimas para buscar tanto actividades glicosidasa, como actividades glicosiltransferasa. Se produjeron un total de doce enzimas, ya que cada una se clonó en dos vectores diferentes (pET28b(+) y pET22b(+)) por lo que cada enzima se tiene por duplicado, una con cola de histidinas en el extremo *N*-terminal (-NTag), lo que facilita su purificación pero podría inactivar la enzima, y otra sin cola.

III.1.2.6.1. Búsqueda de actividades glicosidasa y de transglicosidación con enzimas clonadas de *T. thermophilus* PRQ25

Se midió la actividad glicosidasa de las 12 enzimas purificadas de *T. thermophilus* PRQ25 por el método continuo según el protocolo descrito en el apartado V.2.4.1.2 frente a una batería de sustratos hidrolizables. Los sustratos utilizados fueron *p*NF- α -Fuc, *p*NF- β -Fuc, *p*NF- α -Gal, *p*NF- β -Gal, *p*NF- α -Glu, *p*NF- β -Glu, *p*NF- α -Man, *p*NF- β -D-Man, *p*NF- α -GlcNAc y *p*NF- β -GlcNAc. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Como se puede observar, solo la enzima PRQ25_528 en sus dos formas (con cola de histidinas y sin ella) ha mostrado actividad de hidrólisis, la cual ha sido α -glucosidasa, hidrolizando el *p*NF- α -Glu. La versión de la enzima con cola de histidina era más activa (257 frente a 106 UI/mg) debido a que al estar purificada por

cromatografía de afinidad estaba más concentrada. Este resultado confirma que la cola de histidina no inhibe la actividad enzimática, puesto que se obtuvo actividad frente a los mismos sustratos. En la base de datos, esta enzima estaba anotada como α -glucosiltransferasa, lo que demuestra que la predicción bioinformática no había sido correcta, aunque la anotación sí la había identificado como enzima relacionada con azúcares, concretamente con glucosas.

Tabla 16. Resultados del screening de actividades glicosidasa con las enzimas clonadas de *T. thermophilus* PRQ25. Resultados mostrados en UI/mg.

<i>pNF</i>	β -Fuc	α -Fuc	β -Glu	α -Glu	β -Gal	α -Gal	β -Man	α -Man	β -GlcNAc	α -GlcNAc
PRQ25_0443-NTag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_0443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_0528-NTag	-	-	-	257	-	-	-	-	-	-
PRQ25_0528	-	-	-	106	-	-	-	-	-	-
PRQ25_0794-NTag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_0794	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_1525-NTag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_1525	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_1926-NTag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_1926	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_2319-NTag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRQ25_2319	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizó esta nueva α -glucosidasa de *T. thermophilus* PRQ25 para realizar reacciones de transglicosidación y evaluar su capacidad para sintetizar disacáridos, utilizando *pNF*- α -Glu como donador frente a una batería de aceptores compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc, tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2. No se obtuvo síntesis en ninguna de las reacciones ensayadas.

III.1.2.6.2. Búsqueda de actividades glicosiltransferasa con enzimas clonadas de *T. thermophilus* PRQ25

Se llevaron a cabo reacciones glicosiltransferasa utilizando como donador guanosin difosfato- α -D-manosa (GDP-Man) y uridin difosfato- α -D-glucosa (UDP-Glu) según el protocolo del apartado V.2.4.3.1. Se seleccionaron estos donadores puesto que la anotación de los genes realizada por los autores de la secuenciación, identificaba a las enzimas como diferentes formas de manosiltransferasas o glucosiltransferasas (apartado III.1.2.3). Como aceptores se utilizó una batería de sustratos compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc. No se obtuvieron resultados positivos en las reacciones llevadas a cabo con las hipotéticas glicosiltransferasas de *T. Thermophilus* PRQ25.

Una posible explicación para la ausencia de actividad detectable de algunas de las proteínas expresadas satisfactoriamente en *E. coli* desde *T. thermophilus* PRQ25, tanto de glicosidasas como de glicosiltransferasas, podría estar relacionada con las diferencias de temperaturas de expresión entre el organismo nativo y el hospedador, así como sus diferentes maquinarias enzimáticas, que provocaría la formación de intermediarios de plegamiento no activos.

Otra explicación podría ser que la búsqueda de genes basada en la anotación del genoma al ser secuenciado, no haya predicho correctamente todas las posibles actividades glicosidasa y glicosiltransferasa, y por ello no hayan sido seleccionados y clonados aquellos genes que sí mostraron actividad al llevar a cabo las reacciones con células enteras (apartado III.1.2.2)

Como conclusión, cabe destacar que en los dos apartados del primer capítulo de esta Memoria, se han encontrado dos nuevas enzimas glicosidasa con actividad hidrolítica que no habían sido identificadas hasta la fecha, una β -fucosidasa mesófila de la bacteria *C. gelida*, y una α -glucosidasa termófila de *T. thermophilus* PRQ25. Si bien es cierto que no han demostrado ser capaces de realizar reacciones de

transglicosidación, son muchas las aplicaciones biotecnológicas para las que se han usado reacciones de hidrólisis catalizadas por glicosidasas. En la industria alimentaria se han utilizado amilasas y xilanasas para hidrolizar azúcares de cadena larga no metabolizables, lo que aumenta el valor nutritivo y mejora las características organolépticas de los alimentos (Collins y *col.* 2005; Yegani y *col.* 2013). También se han utilizado lactasas para hidrolizar la lactosa de los productos lácteos y así evitar los problemas de salud ligados a la intolerancia a este disacárido (Oliveira y *col.* 2011). Las glicosidasas relacionadas con el procesado del almidón (α -amilasa, glucoamilasa, β -amilasa y pululanasa) suponen cerca del 30 % de la producción enzimática industrial a nivel mundial (Buchholz y *col.* 2005). Las celulasas tienen aplicaciones para la degradación de materiales vegetales de desecho (hidrólisis de celulosa a glucosa), lo que se aprovecha para la producción de etanol (Karnaouri y *col.* 2013). En la industria del papel se utilizan xilanasas para extraer hemicelulosa de la pasta de papel (Hakala y *col.* 2013). También se añaden glicosidasas a los detergentes para el lavado de los tejidos de algodón y ayudar en el mantenimiento de los colores (Ito y *col.* 1998). En biotecnología clínica, se han usado α -galactosidasas para modificar el antígeno de la sangre tipo B para producir sangre tipo 0 (Goldstein y *col.* 1982; Hata y *col.* 2004). En biología molecular, la β -galactosidasa de *E. coli* (LacZ) se usa habitualmente como marcador para confirmar el correcto clonaje de genes, gracias a su capacidad para hidrolizar el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (Xiong y *col.* 2012).

III.2. Capítulo 2: Síntesis de disacáridos de interés biológico mediante glicosidasas

Tal y como se describió en la Introducción, una de las estrategias enzimáticas empleadas en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico consiste en la utilización de glicosidasas. Concretamente, en la síntesis de los disacáridos Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc destaca una enzima producida por *Bacillus circulans* ATCC 31382, la β -Gal-3. Esta enzima fue descrita por Ito y col. (1997), pero desde entonces no existían demasiados estudios de los procesos catalizados por ella. Ante el potencial de la β -Gal-3 aplicado a la síntesis de disacáridos de interés biológico, se decidió llevar a cabo un nuevo proceso de producción que permitiera su fácil purificación para su posterior utilización y caracterización.

III.2.1. Producción y purificación de la enzimas β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

La cepa ATCC 31382 de la bacteria *B. circulans* fue adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés American Type Culture Collection). Una vez crecida se extrajo su DNA total (apartado V.2.2.1) para poder amplificar el gen de la β -Gal-3.

Se diseñaron dos juegos de oligos, un par previsto para el clonaje del gen en el plásmido pET28b(+) y el otro para el clonaje en pET22b(+) (**Tabla 30**). El par para clonar en pET28b(+), llamados B-gal-3-FW y B-gal-3-28RV se diseñaron para integrar en la enzima la cola de histidinas del extremo *N*-terminal que lleva este plásmido y respetar el codón STOP al final del gen. A esta enzima la denominamos β -Gal-3-NTag.

Por otro lado, para clonar en el pET22b(+), se utilizó el mismo B-gal-3-FW que anteriormente, y se diseñó B-gal-3-22RV, para que integrara en el extremo *C*-

terminal de la enzima, la cola de histidina que lleva el plásmido integrada. El oligo reverso llevaba cambiado el codón STOP del final del gen, para que la traducción del ribosoma pudiera continuar hasta el siguiente codón STOP.

En ambos casos, los oligos reversos llevaban la diana para la enzima de restricción HindIII. No fue necesario añadir ninguna diana para enzimas de restricción al inicio del gen, puesto que este ya incluía de forma natural una diana para NdeI, por lo que los oligos directos se diseñaron de forma que fueran complementarios de una región anterior a la del inicio del gen. A esta enzima la denominamos β -Gal-3-CTag.

Una vez crecida la bacteria se extrajo su DNA total (apartado V.2.2.1), y se amplificó el gen de la β -Gal-3, según las condiciones de PCR de la Tabla 17 y la metodología del apartado V.2.2.3. Finalizada la PCR, se corrió un gel de agarosa para comprobar que la amplificación fuera correcta y purificar el DNA (apartado V.2.2.7).

Tabla 17. Condiciones de PCR par amplificar la secuencia del gen de β -Gal-3.

	Componente	Concentración final
Ciclo 1: (1x)		
- 95 °C 5 min	Tampón Tth 10X	10% (v/v)
Ciclo 2: (30x)	Tth polimerasa	0,75.µl
- 95 °C 1 min	Pfu polimerasa	0,25.µl
- Gradiente de 45 a 60 °C 1 min	dNTPs	1,25 mM (cada uno)
- 72 °C 3 min	Oligonucleótido FW	0,5 mM
	Oligonucleótido Rv	0,5 mM
Ciclo 3: (1x)	DNA molde	1 ng.µl ⁻¹
- 72 °C 10 min	MgCl ₂	2 mM
Ciclo 4: (1x)	DMSO	8 % (v/v)
- 4 °C ∞ min	mqH ₂ O	hasta 50 µl

Una vez purificado el DNA del gel de electroforesis, se llevó a cabo la digestión con las enzimas NdeI y HindIII sobre la secuencia amplificada y los plásmidos, para crear extremos cohesivos entre ellos. Después se realizó la ligación (apartado V.2.2.4) y posterior transformación por choque térmico en *E. coli* DH5α para

seleccionar las construcciones correctas y multiplicar el número de plásmidos (apartado V.2.1.4.1). De las colonias que crecieron se seleccionaron tres de cada (β -Gal-3-NTag y tres de β -Gal-3-CTag), para extraer su plásmido y ser enviadas a secuenciar y confirmar que las secuencias eran correctas (apartado V.2.2.6). También se realizó una digestión con *NdeI* y *HindIII* (apartado V.2.2.4) y se corrió un gel de agarosa (apartado V.2.2.7) para confirmar la presencia de una banda del tamaño del plásmido y otra del tamaño del gen.

Con los plásmidos extraídos de *E. coli* DH5 α se realizó una transformación por choque térmico en *E. coli* BL21, cepa especializada en al producción de proteínas recombinantes. Entre las colonias crecidas, se tomaron tres de β -Gal-3-NTag y 3 de β -Gal-3-CTag para realizar una prueba de inducción (apartado V.2.1.5). Con los cultivos crecidos se corrió un gel de acrilamida para comprobar los niveles de expresión (apartado V.2.3.2.1). El resultado se muestra en la Figura 29. Como se puede observar, hay una gran banda expresada en todos los plásmidos en aquellos carriles que fueron inducidos con IPTG.

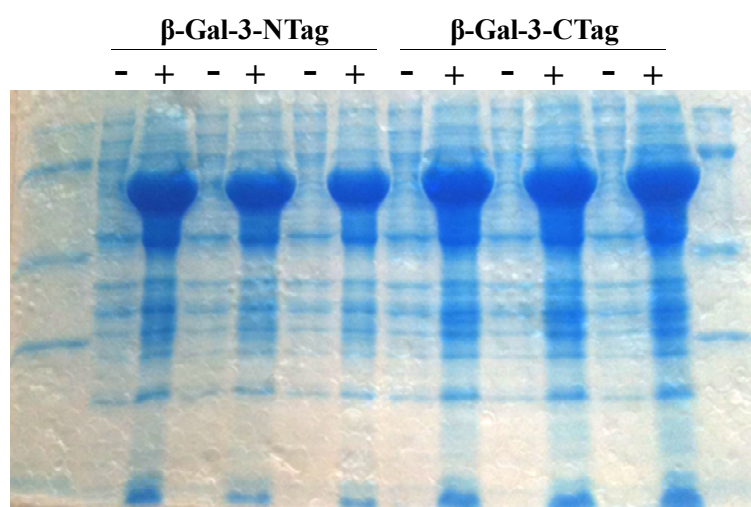


Figura 29. Prueba de inducción de la enzimas β -Gal-3-NTag y β -Gal-3-CTag. Los carriles etiquetados con – no están inducidos con IPTG. Los carriles + están inducidos con IPTG

Para poder caracterizar las enzimas, se crecieron ambas (β -Gal-3-NTag y 3 de β -Gal-3-Ctag) y se llevó a cabo un proceso de producción (apartado V.2.1.5), rotura de células (apartado V.2.1.6) y purificación por colas de histidina en columna de níquel (II) (apartado V.2.3.4). En la Figura 30 se muestra un perfil de purificación de la enzima β -Gal-3-NTag.

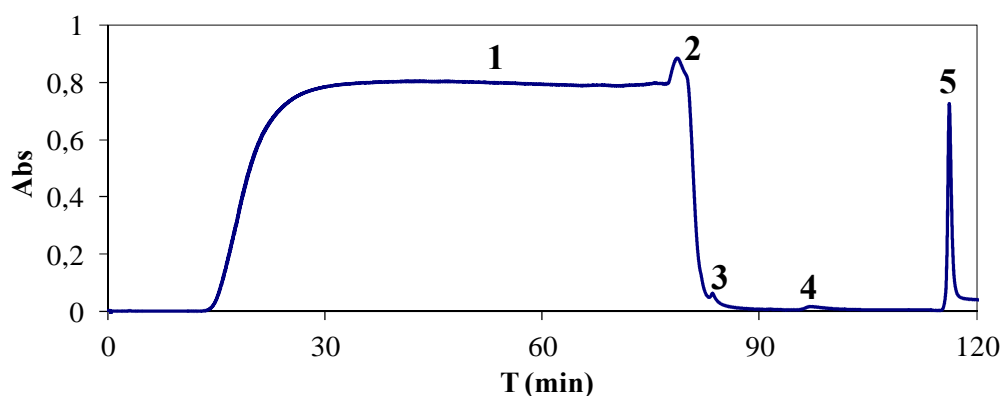


Figura 30. Perfil de purificación de la enzima β -Gal-3-NTag. 1: Proteínas no unidas a la columna. 2: Proteínas no unidas debido a la saturación de la columna. 3: Proteínas unidas por unión inespecífica eluidas con el tampón de adhesión. 4: Proteínas unidas por unión inespecífica eluidas con el tampón de lavado. 5: Enzima β -Gal-3-Ntag eluida con el tampón de elución.

Una vez purificadas las enzimas se midió su concentración por el método de Bradford (apartado V.2.3.1) y se corrió un gel SDS-PAGE para comprobar su pureza (apartado V.2.3.2.1). Como se puede observar en la **Figura 31**, las bandas de los carriles 3 y 4, correspondientes a las enzimas β -Gal-3-Ntag y β -Gal-3-Ctag purificadas, presentan un alto grado de pureza.

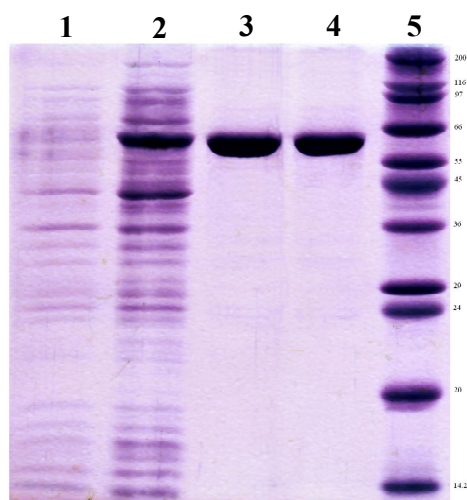


Figura 31. Gel SDS-PAGE de la purificación de β -Gal-3-NTag y β -Gal-3-CTag. Carril 1: Extracto celular sin inducir con IPTG. Carril 2: Extracto celular inducido con IPTG. Carril 3: β -Gal-3-NTag purificada. Carril 4: β -Gal-3-CTag purificada. Carril 5: Patrones de peso molecular.

La cantidad total de cada una de las dos enzimas purificadas es de 21 mg por litro de cultivo en el caso de la β -Gal-3-NTag y de 9 mg por litro en el caso de la β -Gal-3-CTag (dato proveniente del valor medio de varias producciones). Estas diferencias se deben a que en presencia de kanamicina, el antibiótico utilizado para la selección cuando se usa el plásmido pET28b(+), la cantidad de biomasa de *E. coli* contenida en el cultivo es mayor a la obtenida usando ampicilina, el antibiótico utilizado para la selección cuando se usa el plásmido pET22b(+).

III.2.2. Estudio de potenciales actividades glicosidasa de las enzimas β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

Se realizó un cribado de potenciales actividades glicosidasa de las enzimas β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 preparadas en el laboratorio. Para ello, se utilizó una batería de sustratos activados en la posición anomérica con una molécula de pNF, tal y como se muestra en el apartado V.2.4.1.2. Los sustratos utilizados fueron

p NF- α -Fuc, p NF- β -Fuc, p NF- α -Gal, p NF- β -Gal, p NF- α -Glu, p NF- β -Glu, p NF- α -Man, p NF- β -D-Man, p NF- α -GlcNAc y p NF- β -GlcNAc. Los resultados (Tabla 18) muestran que las enzimas solo son activas frente a p NF- β -gal, resultado que se corresponde con la bibliografía consultada (Ito y col. 1997; Fujimoto y col. 1998). Las actividades detectadas fueron 12,2 UI/mg para β -Gal-3-NTag y 12,5 UI/mg para β -Gal-3-CTag.

Tabla 18. Cribado de actividades glicosidasa en las enzimas recombinantes β -Gal-3-NTag y β -Gal-3-CTag de *Bacillus circulans* ATCC 31382. Los valores están mostrados como unidades enzimáticas (UI/mg).

p NF-	β -Fuc	α -Fuc	β -Glu	α -Glu	β -Gal	α -Gal	β -Man	α -Man	β -GlcNAc	α -GlcNAc
β -Gal-3-NTag	-	-	-	-	12,2	-	-	-	-	-
β -Gal-3-CTag	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-

Como se puede observar en los resultados, la actividad β -galactosidasa de ambas enzimas es muy similar, por lo que la disposición de la cola de histidinas (en el extremo N o C -terminal) no afecta negativamente a la actividad. Esta actividad es mayor que la descrita por Fujimoto y col. (1998) (5,5 UI/mg), los cuales, llevan a cabo la producción de la enzima sin cola de histidina. Estos resultados demuestran que la incorporación de la cola de histidina (indistintamente en el extremo N o C -terminal) facilita la purificación de la enzima y hace que esta sea más eficaz, obteniéndose una actividad 2,3 veces mayor que la obtenida por Fujimoto y col. (1998), por lo que es una metodología apropiada para esta enzima en su aplicación a la síntesis de disacáridos.

Como se comentó en el apartado anterior (III.2.1), la producción total de la enzima β -Gal-3-NTag es mayor (21 mg por litro de cultivo) que la de β -Gal-3-CTag (9 mg por litro de cultivo). Teniendo en cuenta que las actividades mostradas por estas dos enzimas son muy similares, se seleccionó a la β -Gal-3-NTag para ser utilizada en futuros experimentos. Todos los experimentos de este capítulo de la presente Tesis

Doctoral fueron realizados con la enzima β -Gal-3-NTag, pero nos referiremos a ella como β -Gal-3.

III.2.2.1. Cálculo de pH óptimo de reacción de β -Gal-3

Para poder establecer las condiciones óptimas de reacción con la enzima β -Gal-3 se procedió al cálculo de su pH óptimo, según el protocolo del apartado V.2.4.1.3. Para ello, se midió la actividad enzimática utilizando p NF- β -Gal como sustrato a diferentes valores de pH según la metodología descrita en el apartado V.2.4.1.3. El pH óptimo de la enzima resultó estar próximo a 6, aunque mantuvo una destacable actividad en el rango de pH de 5 a 7 (**Figura 32**). Estos resultados se corresponden con los mostrados en la bibliografía por Fujimoto y colaboradores (1998).

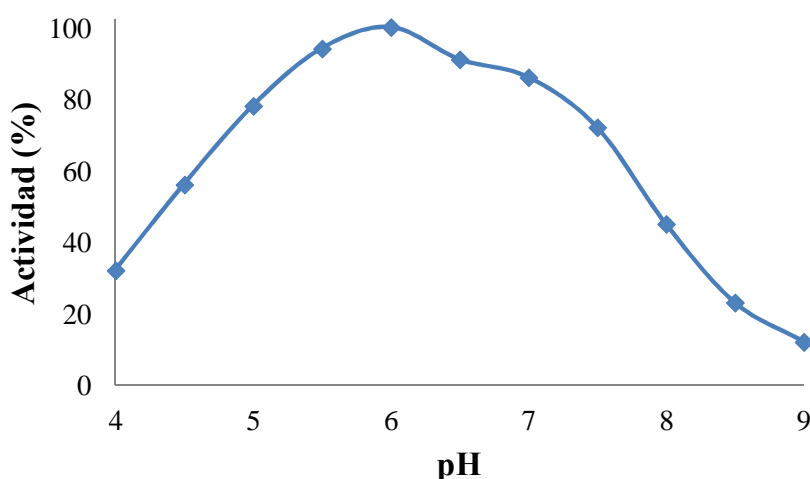


Figura 32. Cálculo del pH óptimo de la enzima β -Gal-3. Se utilizó p NF- β -Gal 5 mM como sustrato a una temperatura de 37 °C. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado.

III.2.2.2. Termoestabilidad de β -Gal-3

Una vez determinado el pH óptimo de trabajo de la enzima, el siguiente paso fue determinar su estabilidad térmica. Para llevar a cabo este estudio se utilizó tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 y se midió su actividad a 37 °C, después de incubar la enzima a diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C), tal y como se explica en el

apartado V.2.4.1.4. Dependiendo de la temperatura utilizada para la incubación, se obtuvo un comportamiento muy diferente en el descenso de la actividad de la enzima (**Figura 33**). A 30 y 40 °C, no se observa apenas descenso en la actividad, manteniéndose el 94% a las 24 h de incubación. A 50 °C se mantiene más del 50% de actividad a las 12 h de incubación. Por el contrario, a 60 °C se observa una pérdida total de la actividad enzimática después de 4 h de incubación (**Figura 33**).

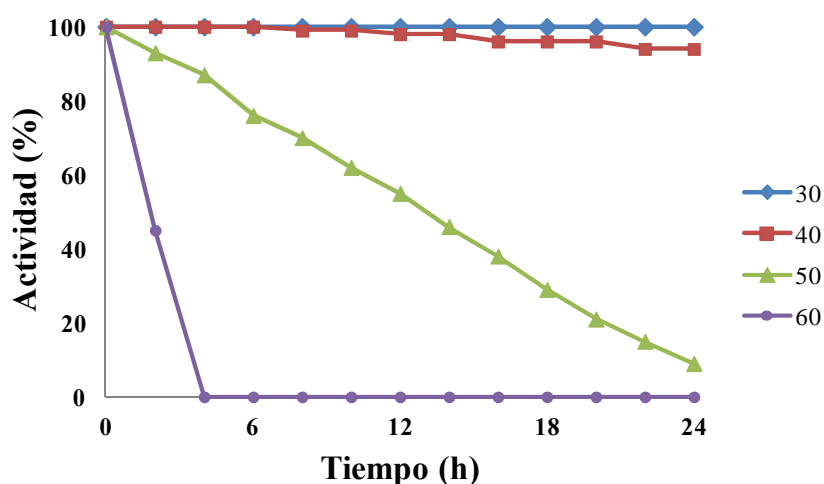


Figura 33. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado en cada una de las series. Estos estudios se realizaron con pNF- β -Gal 5 mM en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 a 37 °C.

III.2.2.3. Temperatura óptima de reacción de β -Gal-3

Una vez establecido el pH óptimo para la reacción y analizada la termoestabilidad de la enzima, el siguiente paso fue determinar la temperatura óptima de trabajo de la enzima. El protocolo se realizó como se describe en el apartado V.2.4.1.5. Como se puede observar en la **Figura 34**, la temperatura óptima detectada para la enzima fue de 50 °C. actividad aumentó a medida que aumentaba la temperatura, encontrándose la máxima actividad a 50 °C. Para posteriores reacciones se determinó 37 °C como temperatura de trabajo, ya que a esta temperatura la enzima conserva el 94% de actividad tras 24 h..

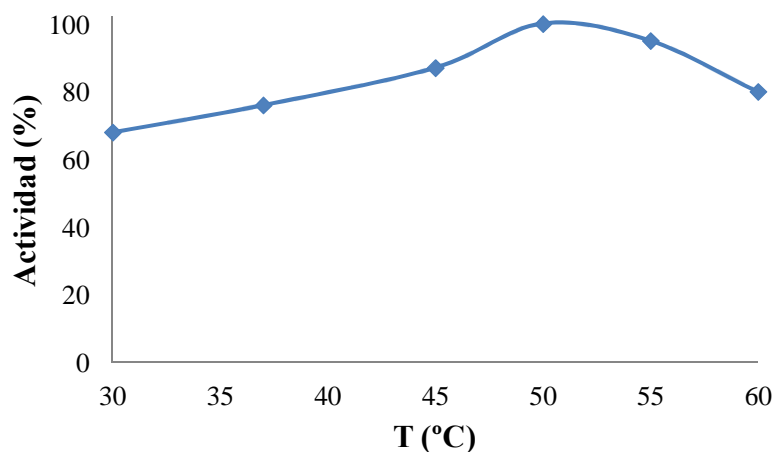


Figura 34. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima β -Gal-3 sobre el sustrato p NF- β -Gal 5 mM en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 a distintas temperaturas. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado.

III.2.3. Síntesis de disacáridos catalizada por la enzima β -Gal-3 DE *B. circulans* ATCC 31382

Puesto que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la síntesis de oligosacáridos de interés biológico y esta enzima tiene un gran potencial para ello, en primer lugar se propuso llevar a cabo un estudio detallado de su capacidad sintética.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado ampliamente con otras glicosidasas y se han puesto a punto las condiciones de trabajo que han permitido desarrollar procesos sintéticos con buenos rendimientos. En esos estudios, ha sido clave la relación entre el aceptor y el donador, obteniéndose en todos los casos que la relación óptima es 1:5, por lo que se decidió tomar este dato como punto de partida (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez, Sandoval, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez y *col.* 2012; Sandoval, Cortés, y *col.* 2012).

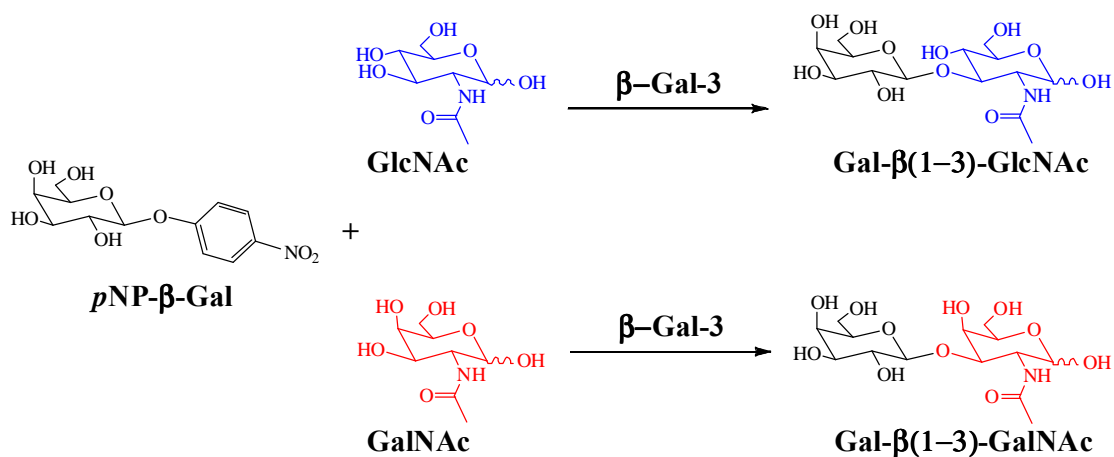
Se realizó un estudio de los diferentes aceptores que podían ser reconocidos por la enzima β -Gal-3. Se utilizó como donador p NF- β -Gal, y como aceptores, una batería

de azúcares compuesta por Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc, según las condiciones de reacción que se exponen en el apartado V.2.4.2.2. Los resultados aparecen en la Tabla 19, en la que se puede apreciar que los únicos aceptores reconocidos por la enzima son Man, GalNAc y GlcNAc. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por otros autores en la bibliografía, donde describen el reconocimiento de estos tres mismos aceptores (Fujimoto y *col.* 1998; Miyasato y *col.* 2004).

Tabla 19. Cribado de aceptores para la reacción de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 utilizando *p*NF- β -gal como donador frente a una batería de monosacáridos.

	Fuc	Fru	Gal	Glu	GalNH ₂	Man	GalNAc	GlcNAc
β -Gal-3	-	-	-	-	-	+	+	+

A raíz de estos resultados, se decidió caracterizar la reacción de transglucosidación de β -Gal-3 utilizando *p*NF- β -gal y como aceptores GalNAc y GlcNAc, para sintetizar Gal- β (1-3)-GalNAc y Gal- β (1-3)-GlcNAc (**Esquema 14**), cuya importancia como disacáridos de interés biológico se describe en el apartado I.1.1 de la Introducción.



Esquema 14. Reacción de trasglucosidación catalizada por la enzima β -gal-3 utilizando como donador *p*NF- β -gal y como aceptores GlcNAc o GalNAc, para la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc y Gal- β (1-3)-GlcNAc

El seguimiento de las reacciones de transglicosidación se realizó por HPLC, como se describe en el apartado V.2.7.1.1. En la **Figura 35** se muestra un cromatograma de la reacción de síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc. En A) se muestra el tiempo 0 h, en el que aparecen los sustratos de partida *p*NF- β -Gal y GlcNAc. En B) se muestra el tiempo 3 h, en el que el sustrato limitante, el donador *p*NF- β -Gal, se ha consumido completamente para la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc. Se mantiene el pico de aceptor GlcNAc debido a que se encontraba 5 veces más concentrado que el donador.

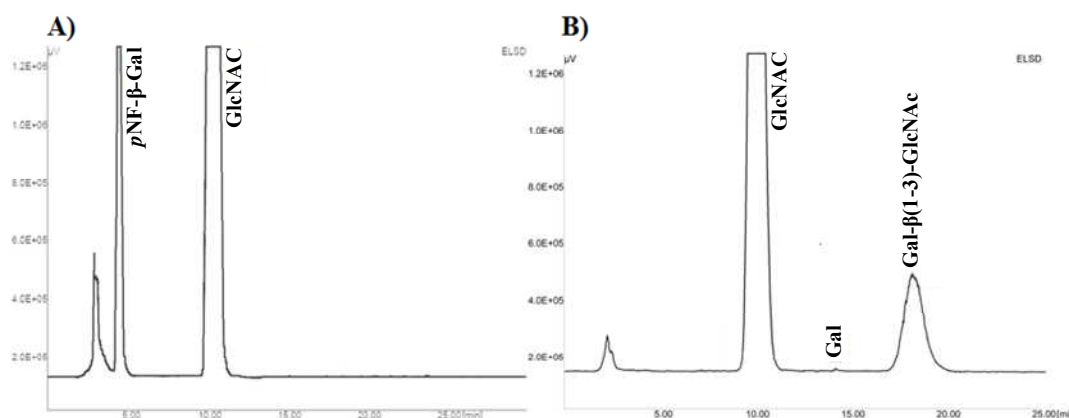


Figura 35. Cromatogramas de HPLC-ELSD de la reacción de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 utilizando *p*NF-gal como donador y GlcNAc como aceptor. A) Tiempo 0 h. B) Tiempo 3 h.

Finalizadas las reacciones, los productos se purificaron purificados en una columna de carbono-celite, según el protocolo del apartado V.2.5.1. El procedimiento de purificación consistió en pasar por la columna volúmenes con concentraciones crecientes de etanol para ir eluyendo gradualmente los diferentes azúcares existentes en el medio de reacción, es decir, dos monosacáridos (GlcNAc o GalNAc y Gal), el disacárido producto, el *p*NF liberado de la hidrólisis o transglicosidación del *p*NF-Gal y las sales del tampón. El disacárido eluyó en la fracción del 10 % de etanol, obteniéndose el cromatograma de la **Figura 36**. En ella se puede observar la completa purificación del disacárido Gal- β (1-3)-GalNAc.

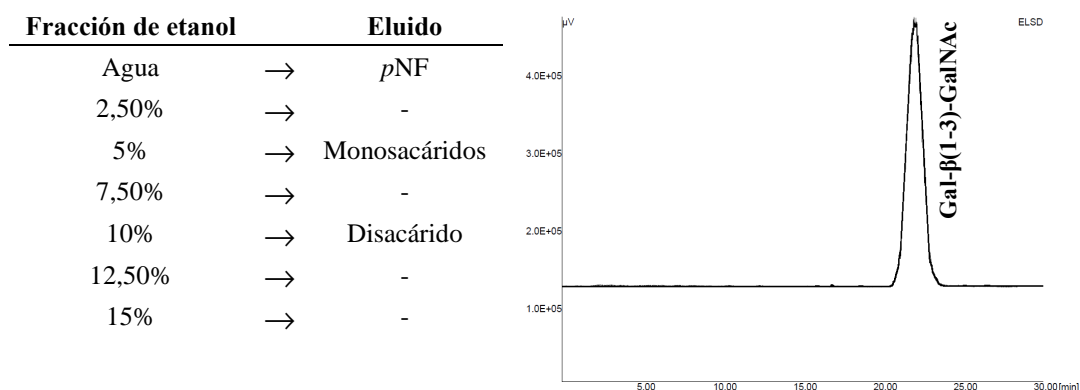


Figura 36. Compuestos eluidos en las diferentes concentración de etanol en la columna de carbono-celite y cromatograma de la fracción del 10 % de etanol con el disacárido Gal-β(1-3)-GalNAc purificado.

La caracterización de los dos productos obtenidos Gal-β(1-3)-GalNAc y Gal-β(1-3)-GlcNAc se llevó a cabo mediante RMN (apartado V.2.7.2), confirmando la estructura de los mismos:

Gal-β(1→3)GalNAc:(Yu y col. 2010) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): 1.92 (s, Ac), 4.58 (d, $J_{1\beta,2} = 8.47\text{Hz}$, H-1 β), 5.11 (d, $J_{1\alpha,2} = 3.71\text{Hz}$, H-1 α). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ 21.96 (Me of Ac, α), 22.19 (Me of Ac, β), 48.92 (C-2 α), 52.39 (C-2 β), 60.89 (C-6 α), 60.93 (C-6 β), 61.11 (C-6'), 68.01 (C-4'), 68.51 (C-4 α), 68.68 (C-4 β), 70.13 (C-5 α), 70.57 (C-2'), 72.48 (C-3'), 74.78 (C-5 β), 74.90 (C-5'), 76.99 (C-3 α), 80.01 (C-3 β), 91.13 (C-1, α), 95.12 (C-1 β), 104.64 (C-1' β), 104.81 (C-1' α), 174.61 (C=O of Ac, α), 174.91 (C=O of Ac, β).

Gal-β(1→3)GlcNAc:(Vetere y col. 2000; Yu y col. 2010) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): 1.96 (s, 3H, Ac), 5.11 (d, $J_{1\alpha,2} = 3.45\text{Hz}$, H-1 α). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ 22.39 (Me of Ac, α), 22.64 (Me of Ac, β), 53.28 (C-2 α), 56.02 (C-2 β), 60.98 (C-6), 61.39 (C-6'), 68.94 (C-4'), 69.10 (C-4), 71.12 (C-2'), 71.62 (C-5 α), 72.95 (C-3'), 75.63 (C-5'), 75.85 (C-5 β), 80.57 (C-3 α), 83.01 (C-3 β), 91.42 (C-1 α), 95.11 (C-1 β), 103.83 (C-1' β), 103.96 (C-1' α), 174.93 (C=O of Ac, α), 175.19 (C=O of Ac, β).

Habiendo caracterizado los productos de reacción y preparado rectas de calibrado para medir concentraciones de disacárido por HPLC, se procedió a medir los rendimientos las reacciones. Para ello, estas se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2 utilizando como *p*NF- β -gal donador y como aceptores GalNAc y GlcNAc respectivamente. Se tomaron alícuotas cada 30 min durante 5 h, que se midieron por HPLC. Los resultados se muestran en la **Figura 37**. Los resultados muestran que en estas condiciones de reacción, el *p*NF-gal se consume totalmente a las 3 h, habiéndose obtenido un rendimiento del 51 % en la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc y del 49 % en la de Gal- β (1-3)-GalNAc. A partir de ese tiempo los disacáridos, al ser sustratos de la enzima, comienzan a ser hidrolizados, aumentando la concentración del producto de hidrólisis (Gal). Esto confirma la importancia de conocer la evolución del proceso de reacción para que se pueda detener en el momento en el que la producción de los disacáridos sea mayor. Además, las reacciones muestran una total regioselectividad hacia la síntesis del disacárido β (1-3).

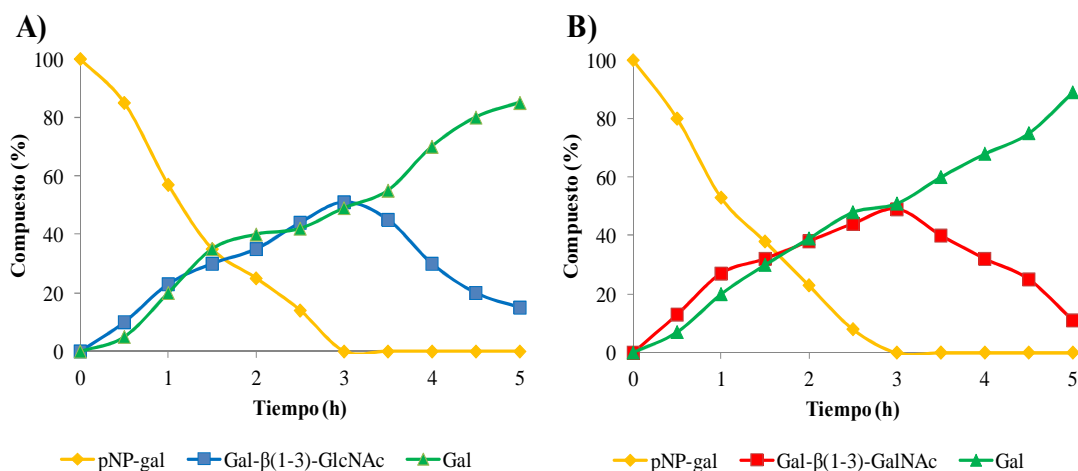


Figura 37. Evolución de las reacciones de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 utilizando como donador *p*NF-gal y: A) GlcNAc como aceptor para la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc o B) GalNAc como aceptor para la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc.

Los resultados de rendimiento obtenidos son mayores que aquellos que muestra la bibliografía, que eran del 12% en la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc y del 10% en la de Gal- β (1-3)-GalNAc (Fujimoto y *col.* 1998). Esto se debe probablemente a que, según la metodología aplicada por estos autores, las reacciones de transglicosidación tenían una duración de 8 h. Según nuestros experimentos, esta es una duración de reacción demasiado larga, puesto que los disacáridos son hidrolizados a partir del momento en que el sustrato limitante (*p*NF- β -gal) es consumido (Figura 37). Además, la relación entre donador y aceptor que aplican estos autores es 1:2, a diferencia de la relación óptima de 1:5 previamente comentada (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011).

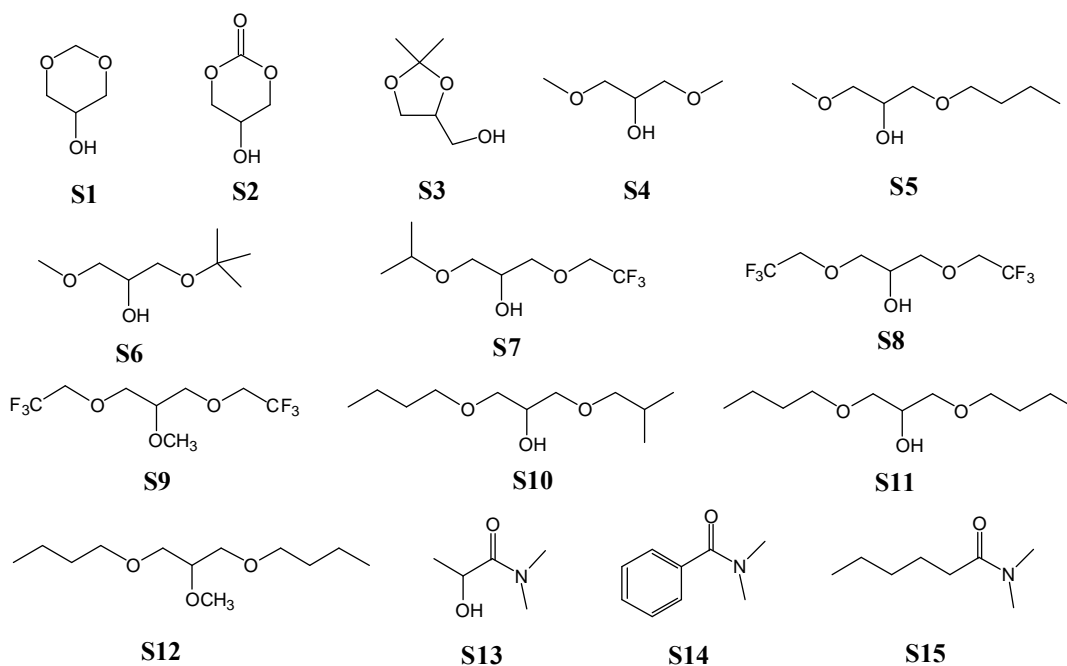
III.2.3.1. Reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa

Como ya se ha comentado en la Introducción, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez, Sandoval, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez y *col.* 2012; Sandoval, Cortés, y *col.* 2012), han demostrado que la presencia de determinados disolventes sostenibles como co-solventes de la reacción de transglicosidación, producen un incremento en el rendimiento y un cambio en la regioselectividad. Estos disolventes sostenibles son en su mayoría derivados producidos de subproductos de la industria (como el glicerol) y de biomasa (como los derivados de la *N,N*-dimetilamida).

Dado que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es la síntesis de disacáridos de interés biológico, se decidió estudiar el efecto de estos disolventes sobre la actividad de la β -Gal-3 de *B. circulans*. Para ello, se utilizaron diferentes disolventes sostenibles obtenidos a partir de biomasa para modificar el medio de reacción y comprobar los efectos que producen en ella. Las estructuras de los mismos aparecen representadas en el

Esquema 15. Por su procedencia y tipo de estructura, éstos disolventes se clasifican en tres grupos: i) derivados cíclicos del glicerol, ii) derivados acíclicos del glicerol,

iii) derivados de *N,N*-dimetilamida. En la Tabla 20 se muestran las características físico-químicas, tales como su densidad y LogP (Pérez-Sánchez y *col.* 2012). También se muestra si el sistema es bifásico o monofásico, lo que fue obtenido experimentalmente en el laboratorio.



Esquema 15. Disolventes sostenibles derivados de biomasa utilizados como co-solventes en reacciones de transglucosidación: 1- Los disolventes S1-S3 corresponden a derivados cíclicos del glicerol. Los disolventes S4-S12 corresponden a derivados acíclicos del glicerol y los disolventes S13-S15 corresponden a derivados de la *N,N*-dimetilamida.

Tabla 20. Características físico-químicas de los diferentes disolventes sostenibles derivados de biomasa.(Pérez-Sánchez y *col.* 2012)

Disolvente	Densidad		Sistema
	(g/ml)	Log P	
S1	1.24	-0.057	monofásico
S2	1.41	-0.024	monofásico
S3	1.06	0.030	monofásico
S4	1.07	-0.60	monofásico
S5	0.94	0.14	monofásico
S6	0.91	0.27	monofásico
S7	1.12	1.14	bifásico
S8	1.36	1.42	bifásico
S9	1.27	1.71	bifásico
S10	0.90	1.93	bifásico
S11	0.89	2.07	bifásico
S12	0.89	2.48	bifásico
S13	1.06	-0.69	monofásico
S14	1.15	1.41	monofásico
S15	0.91	1.42	bifásico

Las reacciones se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2 utilizando como aceptores GlcNAc y GalNAc, y añadiendo una concentración 2M de cada uno de los disolventes sostenibles. Esta concentración fue obtenida como óptima en estudios previos de nuestro grupo de investigación.(Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez, Sandoval, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez y *col.* 2012) Los resultados se muestran en la **Figura 38** y **Figura 39**.

En la **Figura 38** se pueden observar los resultados cuando la reacción de transglicosidación se realizó en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa y utilizando como aceptor GlcNAc para la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc. Anteriormente se indicó que el rendimiento de producción de disacárido en la reacción solo con tampón y transcurridas 3 h fue del 51%, respecto a un 49% de hidrólisis (Gal). Los diferentes resultados se pueden reunir en tres grupos. Aquellos

en los que la reacción transcurrió de forma muy similar a la reacción control en solo en tampón: S1, S11 y S15 (con rendimientos de 48, 46 y 58% respectivamente). Aquellos en los que los rendimientos obtenidos fueron más bajos que en la reacción control, que se caracterizaron por una inhibición de la actividad enzimática: S3, S5, S6 y S14, llamando la atención estos dos últimos por la casi total inhibición que causan a la enzima. Por último se encuentran aquellos que mejoraron el rendimiento de la reacción: S2, S4, S7, S8, S9, S10, S12 y S13 (con rendimientos de 65, 68, 86, 71, 86, 93, 74 y 99%). Llama la atención cómo S8 provocó un cambio en la regioselectividad de la enzima, obteniéndose un 28% de disacárido Gal- β (1-6)-GlcNAc. De todos los disolventes que mejoraron el rendimiento de la reacción, el que ofreció mejor resultado fue el S13, con un rendimiento del 99%.

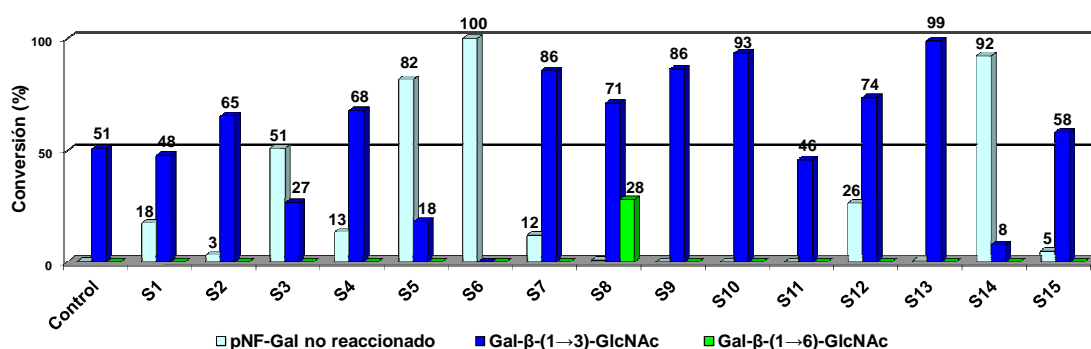


Figura 38. Reacciones de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 utilizando como donador pNF-gal, como aceptor GlcNAc y como co-colventes una batería de disolventes sostenibles derivados de biomasa.

En la **Figura 39** se muestran los resultados cuando la reacción de transglicosidación se realizó en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa y utilizando como aceptor GalNAc para la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc. Anteriormente se indicó que el rendimiento de producción de disacárido en la reacción solo con tampón y transcurridas 3 h fue del 49%, respecto a un 51% de hidrólisis (Gal). Los resultados de nuevo fueron diversos. Aquellos en los que la reacción transcurrió de forma muy similar a la llevada a cabo solo en tampón: S1, S8 y S15 (con rendimientos de 41, 47 y 48% respectivamente). Aquellos en los que los

rendimientos obtenidos fueron más bajos que en la reacción en solo tampón, que se caracterizaron por una inhibición de la actividad enzimática: S2, S3, S5, S6, S7, y S14. Por último se encuentran aquellos que mejoraron el rendimiento de la reacción: S4, S9, S10, S11, S12 y S13 (con rendimientos de 69, 81, 86, 60, 83, 95%). Como también ocurrió en la reacción con GlcNAc, de todos los disolventes que mejoraron el rendimiento, el co-solvente que ofreció mejor resultado fue el S13, obteniéndose un rendimiento del 95 % hacia la síntesis. Debido a estos buenos resultados, este disolvente fue seleccionado como co-solvente para posteriores experimentos.

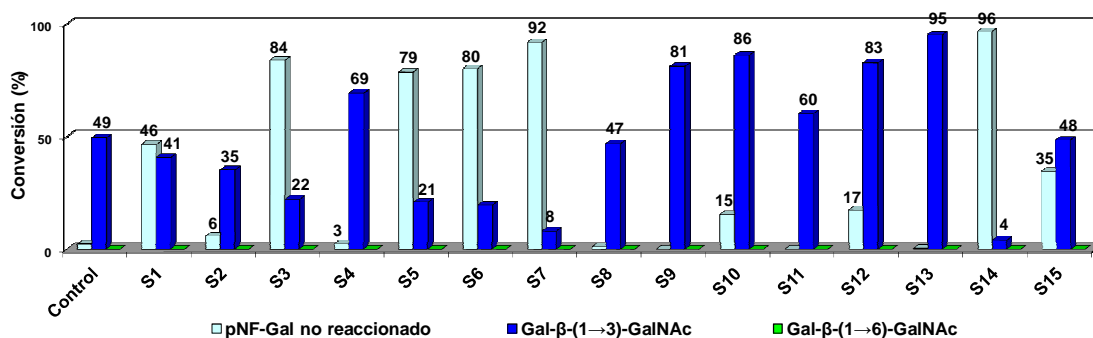


Figura 39. Reacciones de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 utilizando como donador pNF-gal, como aceptor GalNAc y como co-colventes una batería de disolventes sostenibles derivados de biomasa.

A juzgar por las estructuras de los disolventes que aportaron resultados importantes con esta enzima y aquellos que la inactivaron, es difícil establecer una correlación entre su naturaleza química y los resultados obtenidos durante las reacciones. Estos disolventes han sido utilizados anteriormente con la β -galactosidasa comercial Biolacta (Pérez-Sánchez y *col.* 2012) y de *E. coli* (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011), obteniéndose con ellas variaciones en la regioselectividad de las enzimas y mejoras en la síntesis de disacáridos, que han sido explicadas en términos de polaridad, hidrofobicidad e interacciones moleculares con los disolventes.

Con el objetivo de comprobar el efecto de distintas concentraciones del disolvente derivado de biomasa S13 como co-solvente, se llevaron a cabo las reacciones de

transglucosidación (apartado V.2.4.2.2) utilizando *p*NF- β -gal como donador, como aceptores GlcNAc y GalNAc, y distintas concentraciones de S13: 1, 2 y 3M. Los resultados (**Figura 40**) muestran, en ambas reacciones, que la concentración óptima para obtener el mayor rendimiento fue 2M. A concentraciones diferentes (1 y 3 M) los valores de rendimiento fueron menores, aun obteniendo mejores resultados que los obtenidos previamente con solo tampón (51 y 49% respectivamente). Estos resultados demostraron la importancia de trabajar en concentraciones adecuadas de co-solvente y confirmaron que 2 M es la concentración óptima, como en los resultados obtenidos previamente con otras enzimas por nuestro grupo de investigación (Pérez-Sánchez, Cortés-Cabrera, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez, Sandoval, y *col.* 2011; Pérez-Sánchez y *col.* 2012).

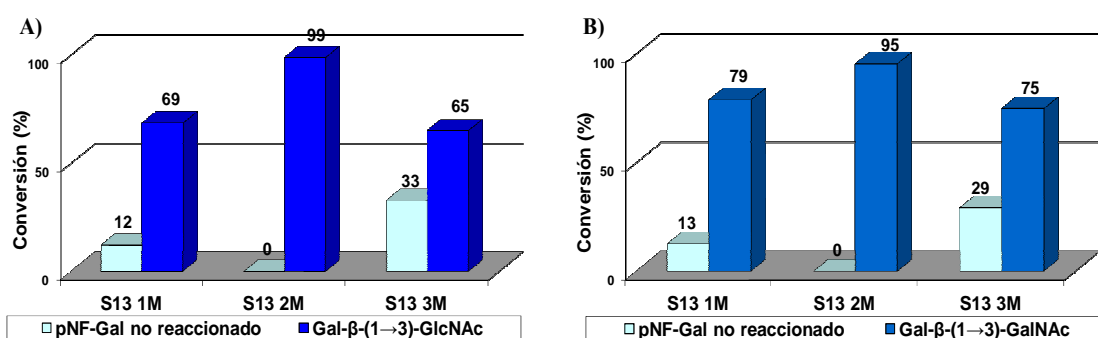
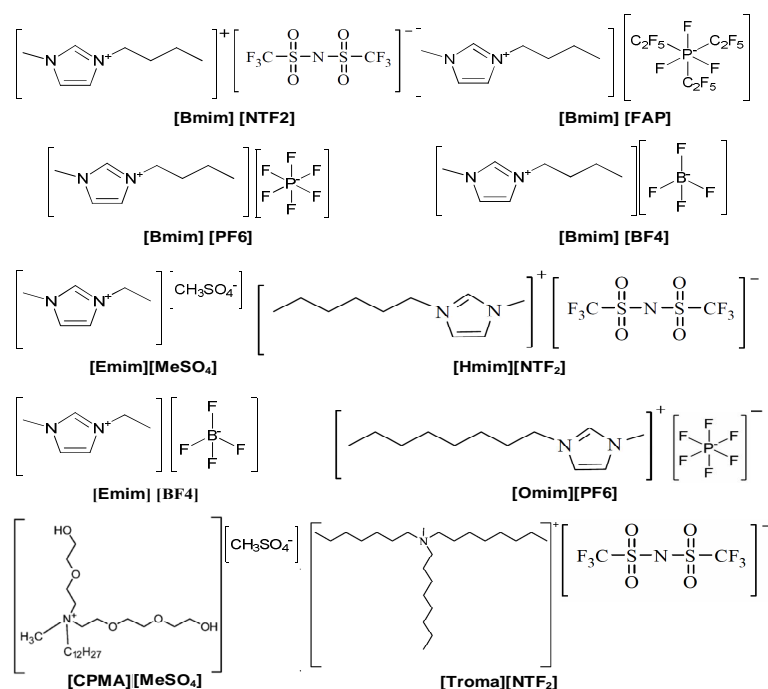


Figura 40. Efecto de la concentración de S13 en el rendimiento de las reacciones de transglucosidación de la enzima β -Gal-3 utilizando como donador *p*NF-gal y como aceptor: A) GlcNAc y B) GalNAC.

III.2.3.2. Reacciones de transglucosidación en presencia de líquidos iónicos (LIs)

Para evaluar este tipo de disolventes sostenibles, se utilizaron diferentes tipos de LIs como co-solventes de las reacciones de transglucosidación. Los LIs utilizados en este estudio aparecen representados en el **Esquema 16**. La cantidad de LI utilizada para cada reacción fue de un 30%, ya que los datos bibliográficos previos demuestran que las enzimas β -galactosidasa que emplearon presentan mejores rendimientos y una

Se evaluaron en total 10 diferentes LIs, en su mayoría insolubles en agua a temperatura ambiente e incluso a las temperaturas de reacción (37°C) (Tabla 21), siendo este hecho, una gran ventaja porque posibilita la recuperación del LI por simples procedimientos como la centrifugación o la decantación. Este es el caso de: [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆] y [Troma][Ntf₂]. En algunos casos se utilizaron cationes derivados del imidazolio ([Bmim][PF₆] y [Omim][PF₆]) y en otros casos derivados de amonio cuaternario [CPMA][MeSO₄] y [Troma][Ntf₂]. Como aniones se utilizaron de forma predominante el hexafluorofosfato (PF₆⁻), la *bis*-triflimida (Ntf₂⁻), y el monometilsulfato (MeSO₄⁻). El detalle de las estructuras moleculares de los diferentes LIs utilizados se muestra en el **Esquema 16**, mientras que las características físico-químicas aparecen en la Tabla 21.



Esquema 16. Líquidos iónicos utilizados como co-solventes en reacciones de transglicosidación.

Tabla 21. Características físico-químicas de los diferentes líquidos iónicos.

Compuesto	Masa molar (g.mol ⁻¹)	Densidad (g.mL ⁻¹)	Conductividad (mS ⁻¹)	Log P	Solubilidad en agua (30% m/v)
[Bmim][BF ₄]	226,03	1,12	2,3	N/D	insoluble
[Bmim][FAP]	584,2	1,63 (Xiao y col. 2012)	2,3a (Xiao y col. 2012)	N/D	insoluble
[Bmim][NTf ₂]	419,36	1,44	N/D	N/D	insoluble
[Bmim][PF ₆]	284,2	1,24 (Fredlake y col. 2004)	0,146 (Suarez y col. 1998)	-2,39 (Kaar y col. 2003)	insoluble
[Emim][MeSO ₄]	174	1,34	N/D		insoluble
[Emim][BF ₄]	198,0	1,24	1,4 (Fuller y col. 1997)	-2,66 (Lee 2005)	soluble
[Hmim][NTf ₂]	475,5	1,25	N/D	0,79 (Lee 2005)	insoluble
[Omim][PF ₆]	340,3	1,37 (Kumar 2008)	N/D	-0,35 (Lee 2005)	insoluble
[Troma][NTf ₂]	648,9	1,08 (Kilaru y col. 2007)	0,04 ^{a, c}	N/D (Zhao y col. 2009)	insoluble
[CPMA][MeSO ₄]	517,7	1,21	N/D	N/D	soluble

Las reacciones con la enzima β -Gal-3 se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2 utilizando pNF- β -Gal como donador, y como aceptores GalNAc y GlcNAc, añadiendo una concentración del 30% de cada uno de los LIs. Los resultados se muestran en la **Figura 41** y en la **Figura 42**.

En la **Figura 41** se pueden observar los resultados cuando la reacción de transglicosidación se realizó en presencia LIs y utilizando como aceptor GlcNAc para la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc. Anteriormente se indicó que el rendimiento de producción de disacárido en la reacción solo con tampón y transcurridas 3 h, fue del 51%, respecto a un 49 % de hidrólisis (Gal). Las reacciones con los LIs [Bmim][Bf₄], [Bmim][Ntf₂], [CPMA][MeSO₄], [Emim][Bf₄], [Hmim][Ntf₂] y [Omim][PF₆] mostraron un rendimiento similar al de la reacción solo con tampón, pero un cambio de regioselectividad hacia el disacárido Gal- β (1-6)-GlcNAc, por lo que provocaban en la enzima una pérdida de regioespecificidad. [Bmim][FAP]

inhibió la actividad enzimática casi completamente, con una conversión del sustrato de partida *p*NF-β-Gal de solo un 4%. Es probable que esto se debiera al efecto del anión [FAP] en el medio de reacción, puesto que en otros LIs que presentan el catión [Bmim] se obtuvieron buenos resultados. Con [Emim][MeSO₄], aun siendo consumido completamente el sustrato *p*NF-β-Gal, la reacción estaba orientada hacia la hidrólisis, mostrando solo un 20% de transglucosidación. [Bmim][PF₆] y [Troma][Ntf₂] aumentaron el rendimiento de disacárido producido (97 y 88% respectivamente), siendo el primero el que mejores resultados ofreció, con un rendimiento casi del 100%.

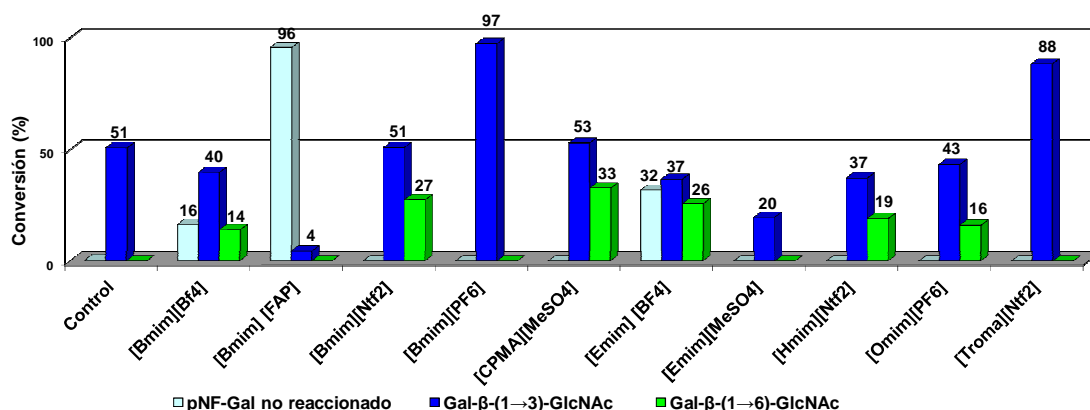


Figura 41. Reacciones de transglucosidación con la enzima β-Gal-3 utilizando como donador *p*NF-gal, como aceptor GlcNAc y como co-solventes una batería de líquidos iónicos.

En la **Figura 42** se muestran los resultados obtenidos cuando la reacción de transglucosidación se realizó en presencia de LIs y utilizando como aceptor GalNAc para la síntesis de Gal-β(1-3)-GalNAc. [Bmim][Bf₄], [Bmim][Ntf₂] y [Emim][Bf₄] provocaron un rendimiento muy similar al obtenido en la reacción solo con tampón, pero perdiendo regioespecificidad ya que se produjo síntesis de disacárido β(1-6). [CPMA][MeSO₄] es el LI con el que se produjo más disacárido β(1-6), un 23%, respecto al 32% de β(1-3). Con [Emim][MeSO₄], aun siendo consumido completamente el sustrato de partida *p*NF-gal, la reacción estaba orientada hacia la hidrólisis, mostrando solo un 22% de transglucosidación. [Hmim][Ntf₂] y [Omim][PF₆] mejoraron el rendimiento de Gal-β(1-3)-GalNAc respecto a la reacción

solo en tampón (61 y 64% respectivamente), aunque con una pequeña producción de $\beta(1-6)$. [Bmim][PF₆] y [Troma][Ntf₂] aumentaron el rendimiento de disacárido producido (97 y 91 % respectivamente), siendo nuevamente el primero el que mejores resultados ofreció, con una selectividad casi total hacia la transglicosidación. Debido a estos buenos resultados, este disolvente fue seleccionado como co-solvente para posteriores experimentos.

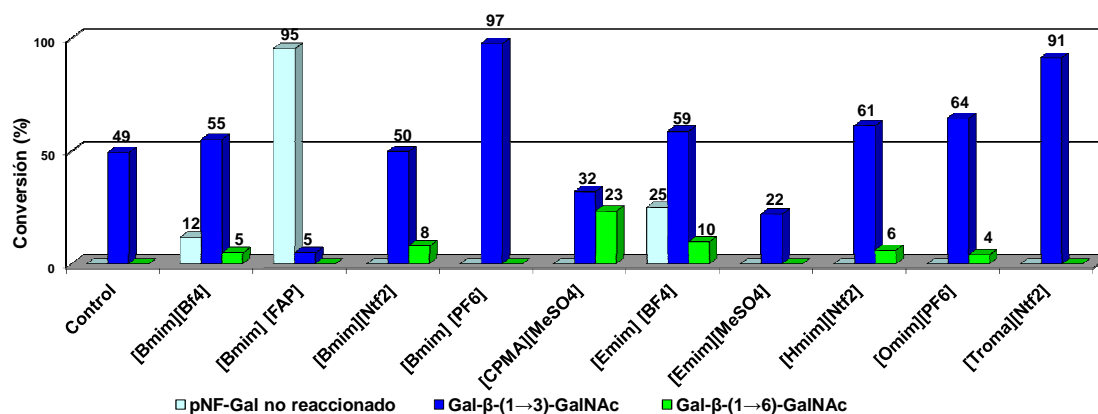


Figura 42. Reacciones de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 utilizando como donador pNF-gal, como aceptor GalNAc y como co-colventes una batería de líquidos iónicos.

Existen pocas referencias bibliográficas sobre el efecto de los LIs con enzimas de tipo β -galactosidasas (Kaftzik y *col.* 2002; Lang y *col.* 2006; Sandoval, Cortés, y *col.* 2012). Así por ejemplo, en los resultados de Kaftzik y *col.*(2002) con la β -galactosidasa de Biolacta, los rendimientos de Gal- $\beta(1-4)$ -GlcNAc pasan de un 30%, de la reacción realizada en tampón, a 58% para la reacción catalizada en el LI [Mmim][MeSO₄] (metilsulfato de 1,3-dimetil imidazolio). Mientras que los resultados obtenidos por Lang y *col.*(2006) con la β -galactosidasa termófila de *P. furiosus* en presencia del mismo LI, mejoran en aproximadamente un 10% los rendimientos de las reacciones de síntesis de distintos galactósidos, que los autores no identifican en dicho estudio. En nuestro grupo de investigación se han hecho estudios de interacción LI-enzima por SPR, espectroscopía de fluorescencia y modelado molecular, sobre el efecto de LIs sobre la actividad de la enzima TTP0042 de

Thermus thermophilus HB27, los cuales provocan un cambio de regioselectividad en la transglicosidación desde el Gal- β (1-6)-GlcNAc hacia el Gal- β (1-4)-GlcNAc (Sandoval, Cortés, y col. 2012).

La variedad de entornos químicos y medios de reacción hacen suponer, que las interacciones propias de cada LI con el medio de reacción y la enzima son las responsables en las modificaciones de la regioselectividad de la reacción. Por este motivo, es que más adelante se planteará un estudio de modelado molecular con [Bmim][PF₆] con la finalidad de explicar este tipo de fenómenos (apartado III.2.4).

Para comprobar el efecto de distintas concentraciones del LI [Bmim][PF₆] como co-solvente de la reacción de β -Gal-3, se llevaron a cabo las reacciones de transglicosidación (apartado V.2.4.2.2) utilizando como aceptores GlcNAc y GalNAc y distintas concentraciones del LI: 15, 30 y 45%. Por encima de esta concentración el medio se volvía demasiado viscoso como para permitir una adecuada agitación. Los resultados (**Figura 43**) muestran que la concentración óptima en ambas reacciones es 30% de [Bmim][PF₆], con una conversión total del sustrato *p*NF- β -Gal y un rendimiento cercano al 100%. En las reacciones con concentraciones diferentes de 30%, los valores de rendimiento son más bajos, aun obteniendo valores de mayores que los obtenidos usando solo tampón (51 y 49% respectivamente). Estos resultados demostraron la importancia de trabajar en concentraciones adecuadas de co-solvente y confirmaron los obtenidos en la bibliografía (Kaftzik y col. 2002) y en estudios previos por nuestro grupo de investigación con la enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27 (Sandoval, Cortés, y col. 2012).

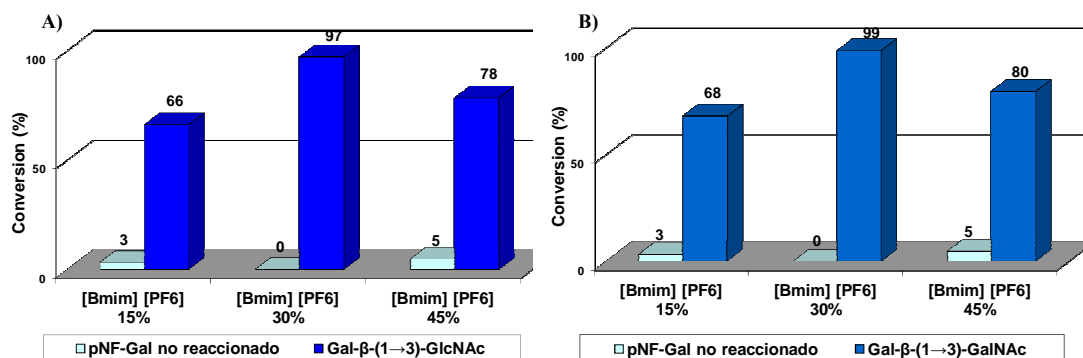


Figura 43. Efecto de la concentración de [Bmim][PF₆] en el rendimiento de las reacciones de transglicosidación de la enzima β -Gal-3 utilizando como donador pNF-gal y como aceptor: A) GlcNAc y B) GalNAC.

De los resultados podemos concluir, que la concentración de LI afecta de forma significativa a los rendimientos, sin embargo, teniendo en cuenta que los LIs utilizados, son en su mayoría insolubles en agua, el fenómeno queda en la interfase del agua y el LI. De ser así, la agitación cumple un papel crucial en la síntesis, pues una eficiente agitación conlleva que el LI se subdivide en pequeñas partículas a modo de emulsión, lo que aumenta significativamente el área de contacto entre el LI y el medio acuoso, haciendo más notorio el efecto del LI sobre la enzima.

III.2.3.3. Escalado de la producción de disacáridos $\beta(1-3)$ en presencia de S13 y [Bmim][PF₆]

En apartados anteriores se ha mostrado cómo el uso de determinados disolventes sostenibles como co-solventes en la reacción de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 puede aumentar el rendimiento de la reacción de transglicosidación para la síntesis de disacáridos $\beta(1-3)$. Concretamente, el uso del derivado de biomasa S13 y el LI [Bmim][PF₆] modifican la selectividad hacia de la enzima hacia el sustrato, de forma que la producción de disacárido se acerca al 100 % con ambos co-solventes (apartados III.2.3.1 y III.2.3.2)

Una vez caracterizada la producción de una molécula en escala analítica, un punto importante que debe ser tenido en cuenta a la hora de pasar a escala preparativa, es la capacidad de purificar dicha molécula de la mezcla de reacción. En el apartado anterior se utilizó una columna de carbono-celite para separar los distintos azúcares de la reacción. Ahora, se debe poner a punto un protocolo para extraer los co-solventes que se añaden a la reacción para aumentar el rendimiento, ya que deben ser eliminados antes de ser cargados en la columna.

Las reacciones se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2 pero en esta ocasión aumentando la escala para 2 g de *p*NF-gal y un volumen total final de 80 ml. La reacción fue seguida por HPLC (apartado V.2.7.1) y detenida las 3 h.

A continuación se exponen por separado los protocolos establecidos para la extracción de cada uno de los co-solventes:

-Extracción del S13:

El S13 es un derivado de *N,N*-dimetilamida líquido a temperatura ambiente y soluble en agua en el que los azúcares son solubles. No pudo ser separado por decantación, percolación, extracción orgánica, liofilización, evaporación rotatoria o durante la purificación en la columna de carbono-celite (resultados no mostrados).

Finalmente se desarrolló un procedimiento eficaz para la extracción del S13, descrito en el apartado V.2.5.1. Éste se basó en la precipitación de los azúcares en hexano a -196 °C, mientras que el S13 permaneció soluble en el disolvente, que fue retirado por filtración (**Figura 44**). Es importante destacar, que el hexano pudo ser separado del S13 en rotavapor y completamente recuperado. Esta metodología permitió la reutilización del S13 en futuras reacciones (**Figura 45**).



Figura 44. Sólidos del medio de reacción separados de S13

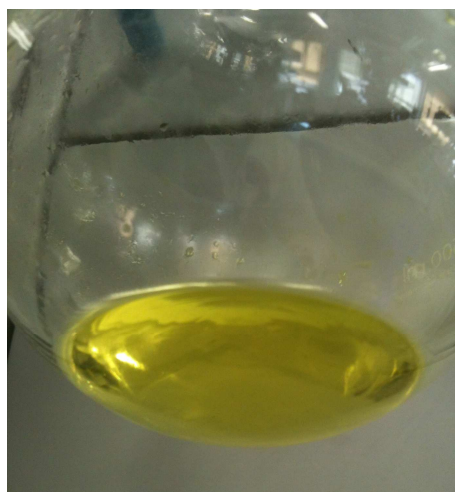


Figura 45. S13 purificado del medio de reacción

-Extracción de [Bmim][PF₆]

Como se explicó en el apartado III.2.3.2, una ventaja del [Bmim][PF₆] es que es insoluble en fase acuosa. Esto permite la separación del LI mediante métodos sencillos como la centrifugación. Lo importante es que los azúcares de la reacción permanezcan en la fase acuosa y no sean arrastrados por el LI. Para comprobar esto, finalizada la reacción de transglucosidación, la mezcla fue centrifugada a 14.000 r.p.m, obteniéndose dos fases diferenciadas, la acuosa y el [Bmim][PF₆]. Se tomó una alícuota de cada una de ellas y se corrió una TLC (apartado V.2.5.4) utilizando como fase móvil acetato de etilo:hexano 50:50. El resultado (**Figura 46**) muestra que los azúcares se encuentran en la fase acuosa (carril 3), quedando el [Bmim][PF₆] libre de estos (carril 2). El poder separar el [Bmim][PF₆] mediante centrifugación supone una gran ventaja en el uso de este LI respecto a lo expuesto en el apartado anterior sobre S13, ya que la extracción es muy sencilla y una vez recuperado puede ser reutilizado en posteriores reacciones.



Figura 46. TLC que muestra la cómo los azúcares de la reacción no son solubles en [Bmim][PF₆]. En el carril 1 aparece la muestra de reacción antes de centrifugar, en el carril 2 aparece la fase de [Bmim][PF₆] después de centrifugar y en el carril 3 aparece la fase acuosa después de centrifugar. [Bmim][PF₆] revela como una mancha blanca y los azúcares como una mancha oscura. Fase móvil: acetato de etilo:hexano 50:50

Una vez extraídos los co-solventes de la mezcla de reacción, se llevó a cabo una purificación en columna de carbono-celite según el procedimiento descrito en el apartado V.2.5.1 y con resultados similares a los obtenidos en la purificación a menor escala en el apartado . Las fracciones del 10% de etanol fueron rotadas y liofilizadas obteniéndose los siguientes resultados:

- En la reacción con S13 se obtuvieron 2,25 g de Gal- β (1-3)-GlcNAc lo que implica un rendimiento del 88% respecto a la cantidad esperada.
- En la reacción con [Bmim][PF₆] se obtuvieron 2,17 g de Gal- β (1-3)-GlcNAc lo que implica un rendimiento del 85% respecto a la cantidad esperada.

III.2.4. Modelado molecular y docking

Con el objetivo de obtener una explicación a nivel molecular del aumento de rendimiento observado en las reacciones con la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC31382 en presencia de algunos disolventes sostenibles, se decidió realizar un estudio de interacción enzima-disolvente mediante modelado molecular, docking y dinámica molecular. Para ello se construyó un modelo tridimensional de la enzima en presencia de estos disolventes sostenibles, y el sustrato donador (*p*NF- β -Gal) y aceptor (GlcNAc) fueron situados en el centro activo de dicho modelo. Posteriormente se llevaron a cabo dinámicas moleculares en presencia y en ausencia del derivado de biomasa S13 y el LI [Bmim][PF₆] y se compararon los resultados entre ellas.

III.2.4.1. Modelado por homología

Puesto que no existe un modelo tridimensional de la estructura de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC31382, se realizó un modelado por homología basado en la estructura de la proteína cristalizada más parecida disponible en el Protein Data Bank (PDB). Esta era la β -galactosidasa de *Bacterioides thetaiotaomicron* (PDB ID: 3D3A), con un 42% de indentidad de secuencia (e-value: $1e^{-146}$). Se utilizaron los servidores de modelado SWISS-Model y CPHmodels-3.0 (apartado V.2.8.2.1) para crear el modelo basándose en el alineamiento de entre estas dos enzimas (**Figura 47**).



Figura 47. Modelado por homología de la enzima β -Gal-3 de *B.circulans* ATCC 31382 (en verde) sobre β -galactosidasa de *Bacterioides thetaiotaomicron* (en morado)

III.2.4.2. Centro activo de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

El centro activo fue localizado usando una combinación de la secuencia de la enzima, alineamiento estructural y un docking ciego. El modelo de la enzima reveló que el centro activo podría ser similar al de la β -galactosidasa de *E. coli* (LacZ). La superimposición de la estructura de un monómero y el modelo utilizado llevaron a la identificación del par de aminoácidos del centro catalítico, siendo éstos: Glu-157 y Glu-233. Con este proceso se consiguió también determinar el comportamiento químico de cada uno de ellos: el residuo Glu-233 corresponde con el residuo Glu-537 de LacZ el cual está actualmente aceptado como nucleófilo (Juers y col. 2001). Mientras que el residuo Glu-157 fue identificado como el ácido catalítico (Glu-461 en LacZ), este hecho es concordante con los primeros resultados de *docking* (**Figura 48**). Se detectaron otros dos aminoácidos en el centro activo que parecen interactuar con el sustrato: Trp-235 y Tyr-450. Este tipo de interacciones han sido ampliamente investigadas, y se han identificado como cruciales en otras galactosidasas, porque orientan el sustrato dentro del centro activo (Spiwok y col. 2004) (**Figura 49**).

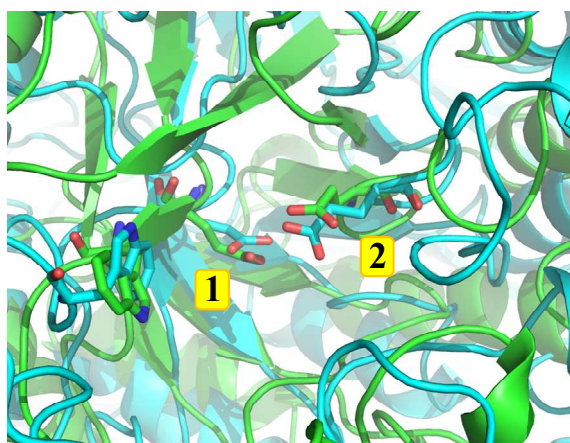


Figura 48. Superposición de las ectructuras del centro activo de β -Gal-3 de *B. Circulans* ATCC 31382 (en verde) y LacZ de *E. Coli* (en azul). El aminoácido 1 es el ácido catalítico y

corresponde con Glu-157 en β -Gal-3 y con Glu-461 en LacZ. El aminoácido 2 es el residuo nucleófilo y corresponde con Glu-233 en β -Gal-3 y con Glu-537 en LacZ.

III.2.4.3. Resultados de *Docking*

Se modeló el complejo sustrato-enzima con el *p*NF-gal en el centro activo para crear el intermedio de reacción Glu-233-gal. Después se realizó el *docking* de GlcNAc en el centro activo de la enzima. Se seleccionó la mejor solución para este *docking* como punto de inicio para simular las dinámicas moleculares. El GlcNAc se orienta en el centro activo gracias a interacciones con el Trp-235 y el Tyr-450, creándose puentes de hidrógeno entre este último con la cadena *N*-acetilo del sustrato (**Figura 49**). Esta interacción provocaría que el hidroxilo del carbono 3 (O3) del GlcNAc quedara enfrente al carbono anomérico (C1) de la galactosa integrante del intermedio de reacción Glu 233-gal y al Glu 157, lo que permitiría que la reacción de transglucosidación tuviera lugar, liberando el producto formado del intermedio de reacción.

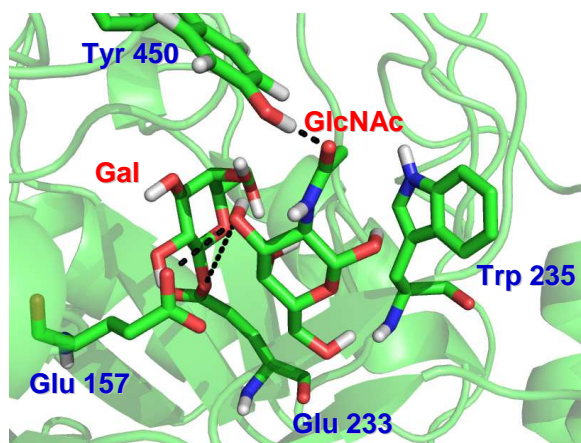


Figura 49. Modelado molecular del centro activo de β -Gal-3 en el que se muestra el intermedio de reacción Glu 233-Gal y docking de GlcNAc

III.2.4.4. Dinámica molecular

La forma y distancia a la que se sitúa el GlcNAc en el centro activo respecto al intermedio de reacción Glu 233-gal, puede variar dependiendo de la flexibilidad de la

enzima y del disolvente utilizado. Las distancias entre el carbono anomérico (C1) y los hidroxilos de la molécula del aceptor, se confirmaron como indicadores válidos de la mejor posición para ser atacada y correlacionada con la regioespecificidad de varias enzimas utilizadas en la síntesis de carbohidratos (Brás y *col.* 2009). Con este objetivo, se midió las distancias entre C1 de la galactosa del intermedio de reacción y el grupo O3 del GlcNAc en presencia de solo agua, en presencia de S13 2M-agua y en presencia del 30% de [Bmim][PF₆]-agua. Los resultados (**Figura 50**) muestran que en presencia de co-solventes como S13 o [Bmim][PF₆] (azul y negro respectivamente), el C1 y el O3 se mantienen próximos durante más tiempo que en presencia de solo agua (verde).

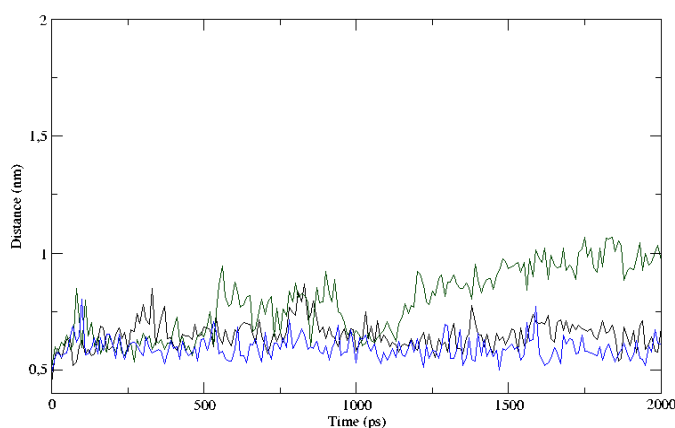


Figura 50. Distancia entre el O3 del GlcNAc y el C1 del intermedio de reacción Glu 233-Gal dentro del centro activo de β -Gal-3. En verde sistema solo con agua, en negro [Bmim][PF₆]-agua y en azul S13-agua.

Según la predicción de la energía de las uniones no covalentes entre el sustrato y el centro activo de la enzima (**Tabla 22**) se puede observar que las uniones son más estables cuando el medio está compuesto por una mezcla de agua y co-solvente que cuando está compuesto solo por agua, por lo que el aumento en el rendimiento podría ser debido a un efecto Circe (Jencks 1975), el cual postula que los aumentos de actividad de una enzima son debidos a un aumento de la afinidad del sustrato por el centro activo. Además, debido a la naturaleza polar de los azúcares y del centro activo, éstos interaccionan fuertemente con las moléculas de agua, por lo que la

energía de desolvatación es mayor cuando el disolvente solo está compuesto por agua que cuando esta está mezclada con los co-solventes S13 y [Bmim][PF₆] (**Tabla 22**).

Tabla 22. Energías de interacción de la enzima β -Gal-3 con el disolvente obtenidas en el estudio de dinámica molecular (media de los valores), cuando el disolvente está compuesto solo por agua, por agua con S13 2M, y por agua con 30 % de [Bmim][PF₆].

Disolvente	Sustrato-Centro activo (kJ/mol)	Sustrato-Disolvente (Fuerzas de van der Waals) (kJ/mol)
Agua	-13.27	-76.54
S13-agua	-14.64	-74.62
[BMIM][PF ₆]-agua	-19.13	-74.83

III.2.5. Estudio del efecto del disolvente en la estructura terciaria de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 por espectroscopía de fluorescencia

Para estudiar el efecto del co-solvente sobre la estructura de la enzima y sus posibles cambios conformacionales, se midieron las variaciones de fluorescencia a diferentes concentraciones del derivado de biomasa S13. Este ensayo no pudo ser realizado con [Bmim][PF₆] debido a que no es soluble en agua, condición fundamental para el experimento.

La enzima fue disuelta en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6 para medir su emisión en forma nativa, obteniéndose su máximo a 340,63 nm. Después, se fueron añadiendo sucesivamente alícuotas de S13, tal y como se explica en el protocolo del apartado V.2.7.3. Como resultado, se fueron obteniendo desplazamientos del máximo de emisión con tendencia hacia el rojo. En la Figura 51 se muestran los

máximos de emisión para las concentraciones de S13 utilizadas en las reacciones de transglicosidación del apartado III.2.3.1 (1, 2 y 3 M). Con una concentración 1 M el máximo de emisión se desplazó hasta 344,76 nm, a 2M se desplazó a 345,87 nm y a 3M el máximo se desplazó a 346,59 nm. Este desplazamiento sugiere una modificación en el ambiente químico de los triptófanos de la enzima, lo que se asocia con una modificación conformacional de su estructura (Vivian y *col.* 2001).

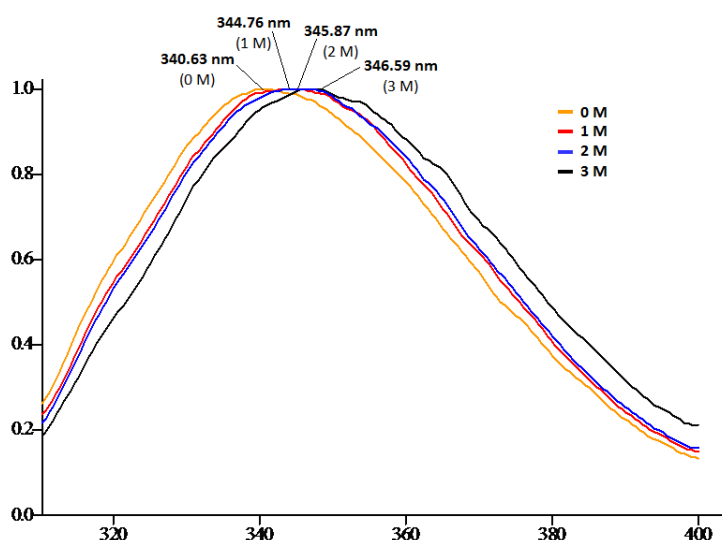


Figura 51. Espectro de emisión de fluorescencia de β -Gal-3 en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,0 y a diferentes concentraciones de S13.

El triptófano es un aminoácido altamente hidrofóbico que se localiza en regiones internas y no expuestas de la enzima. Los resultados sugieren que S13 afecta a la disposición de los triptófanos y, por lo tanto, provoca una modificación en la estructura terciaria de la proteína. Además, los cambios estructurales demuestran ser mayores según va aumentando la concentración del co-solvente S13.

Los resultados de la **Figura 51** confirman lo obtenido en el modelado molecular (apartado III.2.4). Los co-solventes son capaces de modificar la estructura de la enzima, aumentando la afinidad del GlcNAc por el centro activo cuando se encuentra formado el intermedio de reacción entre el Glu-233 y la galactosa (**Tabla 22**). Además, la mezcla de agua con los co-solventes tiene menos afinidad por el GlcNAc

cuando este se encuentra en el centro activo que cuando el disolvente se trata de agua exclusivamente (**Tabla 22**). Estos dos factores conllevan que el hidroxilo del carbono 3 del GlcNAc permanezca más tiempo a una distancia óptima del carbono anomérico de la galactosa para que se produzca la reacción (**Figura 50**). La concentración de co-solvente que maximiza estos efectos es 2M para S13 (**Figura 40**, apartado III.2.3.1) y 30% para [Bmim][PF₆] (**Figura 43**, apartado III.2.3.2).

III.2.6. Inmovilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

Como se explicó en el apartado I.2.5 de la Introducción, la inmovilización de enzimas supone importantes ventajas como la mejora de la estabilidad, la posibilidad de reutilizar el biocatalizador ya que se puede separar fácilmente de la mezcla de reacción, lo que además previene la contaminación por proteínas en el producto final (Bornscheuer 2003).

Por ello se desarrolló un proceso de inmovilización para la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 utilizando dos estrategias:

1. Inmovilización sobre polímeros macroporosos como Eupergit CM, y los polímeros macroporosos de tamaño de poro controlado sintetizados por el Grupo de Investigación.
2. Inmovilización sobre olímeros de glioxil agarosas facilitados por el grupo del Prof. Dr. Guisán

Los resultados obtenidos en cada uno de estos experimentos se detallan a continuación.

III.2.6.1. Inmovilización de β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 sobre polímeros macroporosos de tamaño de poro controlado

Se inmovilizó la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 sobre diferentes polímeros funcionalizados con grupos epóxidos. La estructura de los monómeros y la caracterización de los polímeros se presentan en el apartado V.2.6.1. El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado V.2.6.1.1.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la **Tabla 23**. Como puede observarse en dicha Tabla, los resultados obtenidos con los distintos polímeros han sido muy diversos, obteniéndose los mejores porcentajes de inmovilización con los polímeros más hidrofílicos (poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4, poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10 y Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6 con el 100% de inmovilización). Por el contrario, los polímeros que dan lugar a los peores porcentajes de inmovilización son los más hidrofóbicos (poli(GE-co-DVB)-4 (28%) y poli(BGMPME-co-DVB)-5 (31%) y poli(TGPME-co-DVB)-3 (32%)), dato compatible con el hecho de que la enzima es hidrófila.

Una vez finalizado el proceso de inmovilización, se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general, descrito en el apartado V.2.4.1.2. Los resultados aparecen en la Tabla 23. Como se puede observar, el proceso de inmovilización llevado a cabo con todos los polímeros, origina una drástica pérdida de actividad enzimática, siendo el mejor resultado el obtenido con el polímero Poli(AGE-co-DVB)-74, que conserva un 3,4% de la actividad respecto a la enzima libre.

Tabla 23. Resultados de la inmovilización de β -Gal-3 y actividad enzimática sobre soportes macroporosos funcionalizados con grupos epóxido.

Soporte	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	10,7	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	85	8,5	0,36	3,4
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	78	7,8	0,11	1
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	73	7,3	0,13	1,2
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	100	10	0	0
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	100	10	0,12	1,1
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	100	10	0	0
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	41	4,1	0	0
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	34	3,4	0	0,1
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	43	4,3	0,06	0,6
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	38	3,8	0,03	0,3
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	71	7,1	0,25	2,3
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	60	6	0,11	1
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	46	4,6	0,19	1,8
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	48	4,8	0	0
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	35	3,5	0	0
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	34	3,4	0	0
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	65	6,5	0	0
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	57	5,7	0	0
Poli(GE-co-DVB)-4	28	2,8	0	0
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	31	3,1	0	0
Poli(TGPME-co-DVB)-3	32	3,2	0	0
Eupergit C	45	4,5	0,15	1,4

Esta inactivación, originada por el proceso de inmovilización, puede ser debida a la modificación de la estructura terciaria activa de la enzima, originada por la inmovilización de la enzima por diversos residuos (lisina, cisteína ó histidina) del centro activo de la enzima ó próximos a él. También puede ser debido a la naturaleza de los soportes. Según han descrito otros autores, la inmovilización de enzimas hidrófilas, como las β -glucosidasa de *Aspergillus niger* o la α -quimiotripsina, en polímeros acrílicos como el Eupergit, causan bajos rendimientos debido a las interacciones de la enzima (altamente hidrofílica) con los grupos oxiranos del Eupergit (Levitsky y col. 1999; Tu y col. 2006).

En nuestro grupo de investigación, el Dr. Antonio Aires y el Dr. Manuel Sandoval, obtuvieron resultados similares al tratar de inmovilizar las enzimas de Biolacta y TTP0042 de *T. thermophilus* HB27 en el desarrollo de sus Tesis Doctorales (Aires-Trapote 2012; Sandoval 2012).

Evalutando los resultados obtenidos en este proceso de inmovilización y estabilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C, se decidió no continuar con la caracterización de la enzima inmovilizada y su aplicación en la síntesis enzimática de oligosacáridos en este tipo de soportes.

III.2.6.2. Inmovilización de β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 sobre glioxil agarosas

Debido a que la inmovilización de β -Gal-3 sobre polímeros macroporosos funcionalizados con grupos epóxido no dio buen resultado al no superar el 3,4% de retención de actividad enzimática en el mejor de los casos, se decidió explorar otro tipo de soporte de inmovilización. Este fue glioxil agarosa (Guisán 1988), un polímero funcionalizado con grupos aldehído.

III.2.6.2.1. Estabilización de la enzima en medios alcalinos (pH 10)

El proceso de inmovilización en soportes de glioxil agarosa (Guisán 1988) implica la exposición de la enzima a condiciones de pH en las que no es estable (apartado V.2.6.2.2). Para evitar la desnaturalización de la enzima durante la inmovilización se probaron diferentes agentes estabilizantes para ser añadidos al tampón de inmovilización. Estos fueron: glicerol, trehalosa y polietilenglicol-600 (PEG-600). Estos compuestos se caracterizan por crear múltiples puentes de hidrógeno con las proteínas, lo que evita posibles cambios conformacionales (Jain y col. 2011; Attri y col. 2012; Qiang y col. 2012; Romeo 2012).

Se llevó a cabo la incubación de la enzima en presencia de los diferentes agentes estabilizantes, tal y como se describe en el apartado V.2.6.2.1. Los resultados se muestran en la Figura 29. Sin ningún agente estabilizante, después de 30 min a 4 °C y pH 10, la enzima conserva el 70% de la actividad inicial, y después de 120 min el 30%. En presencia de glicerol, después de 30 min se observa un 90% de actividad y un 50% después de 120 min. La trehalosa conserva el 80% de actividad después de 30 min, manteniendo este valor constante a los 120 min. El mejor resultado fue obtenido con el PEG-600, que mantenía el 100% de actividad de la enzima a los 30 min y solo perdía un 3% a los 120 min, por lo que fue seleccionado como agente estabilizante de la enzima durante el proceso de inmovilización.

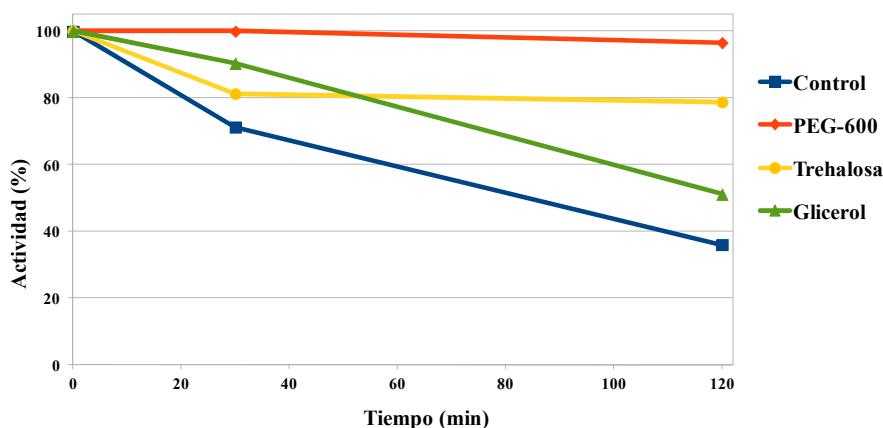


Figura 52. Mantenimiento de la actividad enzimática de β -Gal-3 a 4 °C en presencia de diferentes agentes estabilizantes en las condiciones del proceso de inmovilización en glioxil agarosa: tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH10.

Con el objetivo conservar el máximo posible de actividad a 25 °C, que es la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de inmovilización (apartado V.2.6.2.1), se procedió a probar la incubación a distintas concentraciones de PEG-600, entre 5 y 50 % de PEG-600. Los resultados se muestran en la **Figura 53**. Los mejores fueron obtenidos a una concentración del 50 % de PEG-600 en buffer de inmovilización, en la que la enzima mantenía el 86% de actividad después de 30 min

y el 56 % después de 120 min. Este agente y esta concentración fueron seleccionados para la inmovilización.

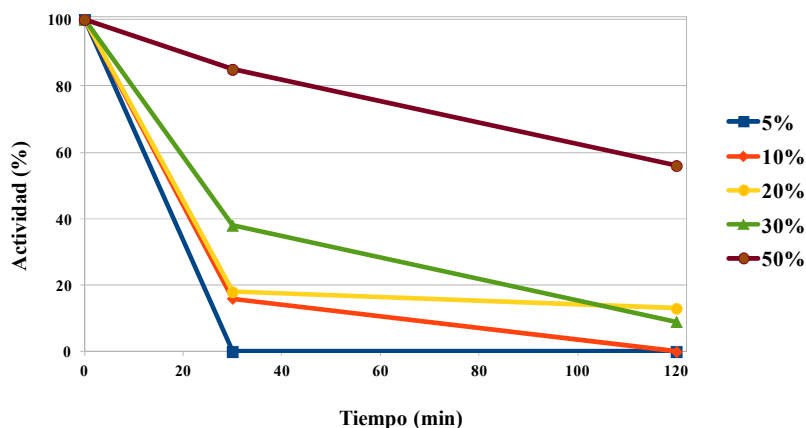


Figura 53. Mantenimiento de la actividad enzimática de β -Gal-3 a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de PEG-600 en las condiciones del proceso de inmovilización en glioxil agarosa: tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH10.

III.2.6.2.2. Estudio de carga enzimática del biocatalizador

Con el objetivo de calcular la cantidad óptima de enzima que puede ser inmovilizada sobre el soporte se estudiaron diferentes valores de carga de proteína. Se llevó a cabo el proceso de inmovilización (apartado V.2.6.2.2) con cantidades crecientes de enzima, desde 0,1 y 2 mg por gramo de soporte (apartado V.2.6.2.3), y posteriormente, se midió su actividad hidrolítica frente a *p*NF-gal (apartado V.2.4.1.2). En todos los casos se inmovilizó la totalidad de la enzima. Los resultados se muestran en la **Figura 54**. Como se puede observar, la cantidad de enzima con la que se obtiene un mejor resultado es 0,5 mg por gramo de soporte, que mantiene un 85% de actividad respecto a la misma cantidad de enzima libre. Con concentraciones diferentes de enzima se obtienen resultados más bajos, que pueden ser debidos a problemas difusionales por limitaciones en el transporte de masa del sustrato dentro del soporte. Con cantidades de enzima por debajo de 0,5 mg/g el sustrato tiene dificultad para llegar a la enzima debido a su baja concentración. Con cantidades por encima se pueden dar efectos de colmatación de los poros del soporte, o bien que las

enzimas agregan unas sobre otras, evitando al sustrato acceder al centro activo de las mismas, por lo que no pueden reaccionar tan bien como la enzima libre

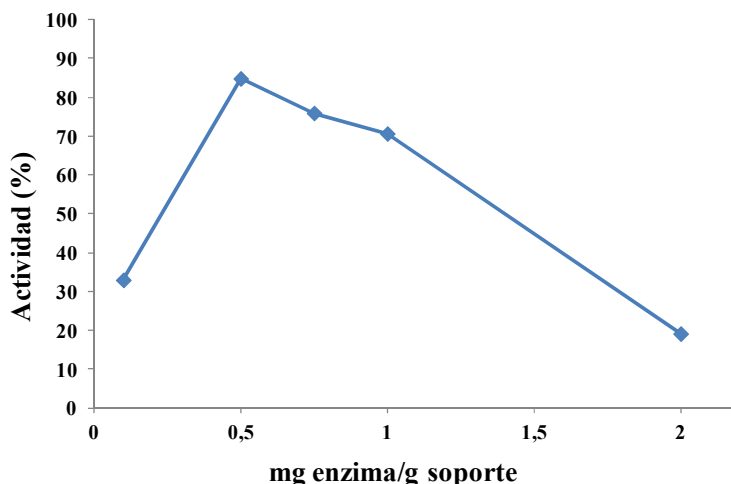


Figura 54. Inmovilización con distintas cantidades de enzima β -Gal-3 por gramo de agarosa glioxal a 25 °C en tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH10 con 50% de PEG-600.

III.2.6.2.3. Influencia del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

La mayor parte de las enzimas modifican su intervalo de pH de trabajo cuando se inmovilizan, al variar el microentorno de la proteína (Moreno, Arroyo, y *col.* 1997; Moreno, Hernáiz, y *col.* 1997). Para poder establecer las condiciones óptimas de reacción con la enzima β -Gal-3 inmovilizada en soportes de glioxil agarosa se procedió al cálculo de su pH óptimo, según el protocolo del apartado V.2.6.2.4. Para ello se realizó la reacción de hidrólisis utilizando *p*NF- β -Gal en distintas condiciones de pH por el método discontinuo. En la **Figura 55** se muestran los resultados superpuestos con los obtenidos previamente para la enzima libre (apartado III.2.2.1), en la que se puede observar que los valores optimos coinciden, manteniéndose en pH 6. La diferencia fundamental que se puede encontrar es que en los extremos (pH 4 y 9) la enzima inmovilizada conserva más actividad que la enzima libre, siendo un 58% a pH 4 respecto al 32% que mantenía la enzima libre, y un 43% a pH 9 respecto al 12% que mantenía la enzima libre. Estos valores indican un aumento en la estabilidad de la enzima a pHs ácidos y básicos, lo que hace de esta se convierta en

un biocatalizador más versátil ya que puede abarcar un abanico más amplio de condiciones.

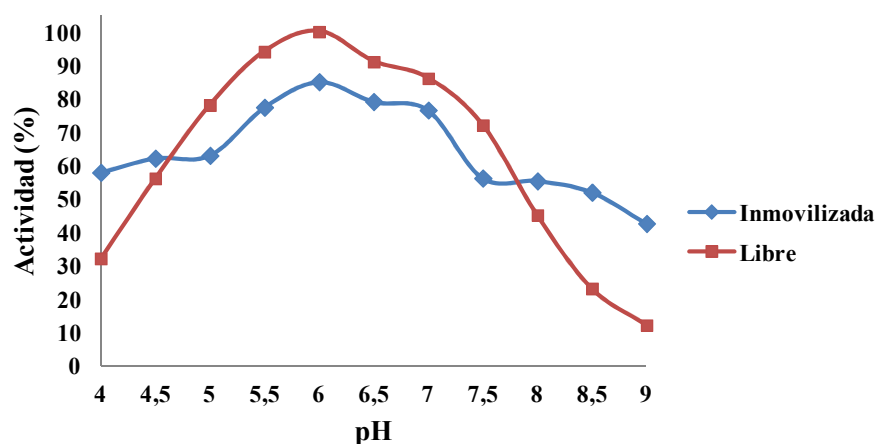


Figura 55. Efecto del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada sobre glioxil agrosa sobre el sustrato p NF- β -Gal e 5 mM a 37 °C. El pH se ajustó con tampones citrato/fosfato de sodio y fosfato de sodio 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado

III.2.6.3. Síntesis de disacáridos catalizada por la enzima β -Gal-3 inmovilizada en soportes de glioxil agarosa

Se estudió la capacidad de la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 inmovilizada en glioxil agarosa para llevar a cabo la reacción de transglicosidación, siguiendo el protocolo del apartado V.2.6.2.5. Se realizaron las reacciones utilizando como aceptores GlcNAc y GlcNAc en presencia de solo tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 y con disolventes sostenibles como co-solventes, concretamente del derivado de biomasa S13 y del líquido iónico [Bmim][PF₆], ya que con estos se habían obtenido los que mejores resultados en las reacciones con la enzima libre (apartados III.2.3.1 y III.2.3.2). Los resultados se muestran en la **Figura 56**. Como se puede observar, en la reacción control, con solo tampón, se obtuvo un resultado del 34% de Gal- β (1-3)-GlcNAc, frente al 51% de la enzima libre. En la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc se obtuvo un 30% con la enzima inmovilizada, frente al 49% de la

enzima libre. La disminución de rendimiento es mayor en el caso de las reacciones con S13, puesto que se pasó de un rendimiento del 99% con la enzima libre a un 55% con la enzima inmovilizada en la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc, y de un 95% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc con la enzima libre a un 29% con la enzima inmovilizada. Los mejores resultados se produjeron con el LI [Bmim][PF₆], con el que la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc con la enzima libre y con la enzima inmovilizada pasó de un 97 a un 74% respectivamente, y la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc disminuyó solo de un 97 a un 91%.

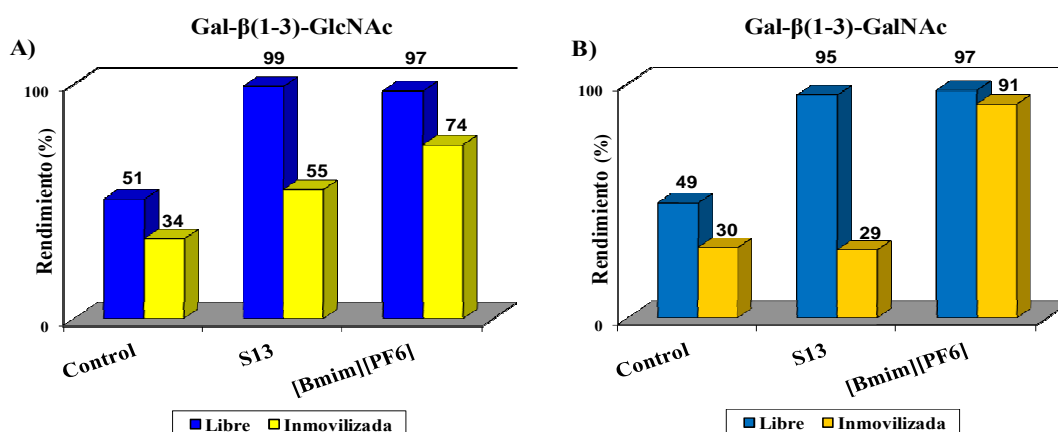


Figura 56. Rendimientos de la reacción de transglicosidación con la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada utilizando *p*NF-gal como donador y como aceptor, en A) GlcNAc y en B) GalNAc.

La bibliografía muestra que la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 había sido inmovilizada en CNBr-sefarosa y ensayada su actividad de transglicosidación utilizando *p*NF-gal como donador y benzil- α -D-GalNAc como donador en presencia de DMF con un rendimiento del 62%, y un 53% utilizando como donador metil- α -D-GalNAc, aunque no midieron la capacidad de reutilización de la enzima (Naundorf y col. 1998). Este rendimiento es mayor que el que se obtuvo en nuestros estudios en la reacción con solo tampón o con S13 como co-solvente, pero inferior al que se obtuvo utilizando como co-solvente [Bmim][PF₆] que llega al 91% en caso del GalNAc. Guisan y col. compararon la inmovilización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces*

lactis en CNBr-sefarosa y en glioxil agarosa (Bernal y col. 2013). Estos autores obtienen menor actividad con el soporte de glioxil agarosa pero mejor estabilización de la enzima. Atribuyen estos resultados a que la glioxil agarosa es un sistema de inmovilización covalente multipuntual, frente al soporte CNBr-sefarosa, que inmoviliza a la enzima por un solo punto de unión, lo que permite que la enzima se comporte de una manera similar a la enzima libre. Por otro lado, la inmovilización multipuntual aumenta la rigidez de la enzima, y por lo tanto, la estabilidad, pero esto a su vez suele implicar un descenso de actividad (Pedroche y col. 2007). Esto se corresponde con los resultados obtenidos, ya que al inmovilizar la β -gal-3 se perdió parte de la actividad comparada con la enzima libre, pero se aumentó la estabilidad frente al pH (**Figura 55** y **Figura 56**). A pesar de que el rendimiento obtenido en la reacción de transglucosidación utilizando GalNAc como aceptor, con la enzima inmovilizada en glioxil agarosa en tampón (30%, **Figura 56**), fue menor que el obtenido en la bibliografía inmovilizando en CNBr-sefarosa (62% y 53%) (Naundorf y col. 1998), esta menor actividad obtenida, debido a la mayor rigidez que adquiere la enzima en la inmovilización con glioxil agarosa, quedó compensada con la adición de [Bmim][PF₆] como co-solvente, con el que se alcanzó un rendimiento del 91% (**Figura 56**).

Los rendimientos son menores con la enzima inmovilizada en glioxil agarosa que con la enzima libre (**Figura 56**), pero se debe tener en cuenta que la principal ventaja de la inmovilización es la posibilidad de reutilizar el biocatalizador. Si puede ser reutilizado, esto podría compensar con creces la pérdida de rendimiento.

III.2.6.4. Reutilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 inmovilizada en glioxil agarosa

Se estudió la posibilidad de reutilizar la enzima inmovilizada en glioxil agarosa. Para ello, primero se comprobó su capacidad de reutilización en la reacción de hidrólisis de *p*NF- β -Gal, según las condiciones del apartado V.2.6.2.6.1. Como se puede ver en la Figura 57, después de 25 reusos la enzima todavía conserva el 53% de la actividad

inicial, lo que indica un gran potencial para ser reutilizada en reacciones de transglucosidación.

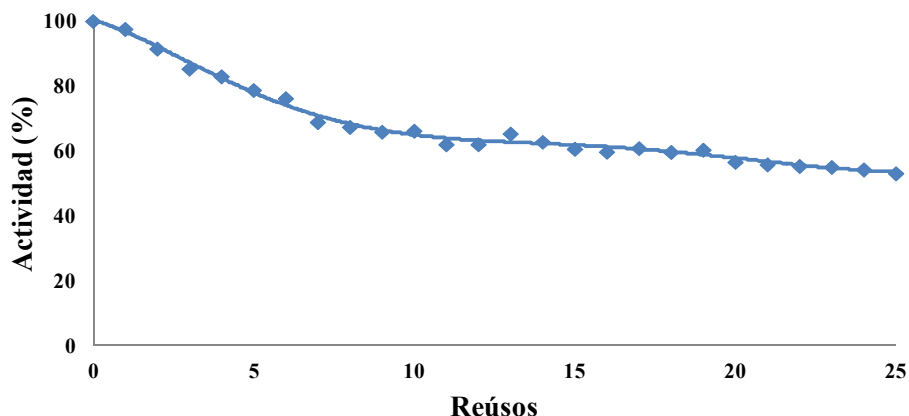


Figura 57. Reutilización de la enzima β -Gal-3 de *B. Circulans* ATCC 31382 en la hidrólisis de *pNF-gal*.

A continuación se llevaron a cabo las reacciones de transglucosidación para medir la evolución de la actividad de la enzima al ser reutilizada (apartado V.2.6.2.6.2). Para ello se utilizó como aceptor GlcNAc tal como describe el protocolo del apartado V.2.6.2.6, en tres medios de reacción: en solo tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6, usando como co-solvente el derivado de biomasa S13 y usando como co-solvente el el LI [Bmim][PF₆]. Como se puede ver en los resultados (mostrados en la Figura 58), las enzimas fueron sufriendo una desactivación gradual que fue más pronunciada en las reacciones con solo tampón y S13. En el reuso número 10, la enzima inmovilizada que había reaccionado en el medio con solo tampón, conservaba el 55% de actividad de transglucosidación, con S13 conservaba el 67%, y con [Bmim][PF₆] el 76%. En el reuso número 20 las enzimas inmovilizadas que habían reaccionado en el medio con solo tampón y con S13 ya habían perdido completamente la actividad, pero la enzima con [Bmim][PF₆] conservaba el 62% de esta. En el reuso número 30, la enzima de la reacción con [Bmim][PF₆] conservaba el 47%, y en el reuso número 40 conservaba el 30% de actividad.

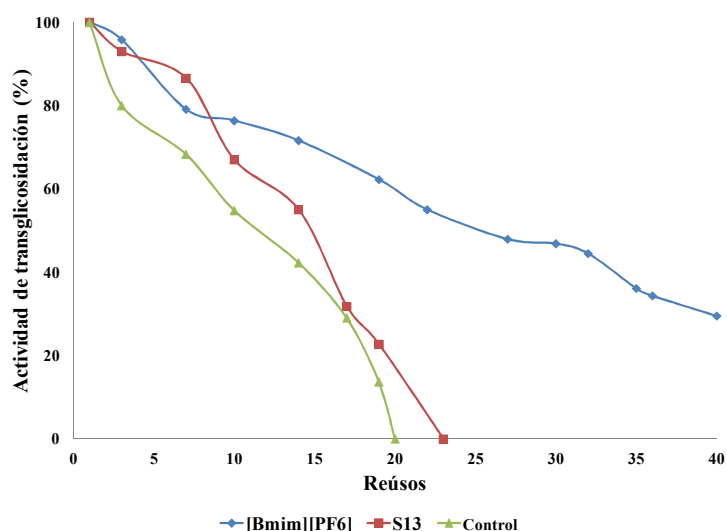


Figura 58. Reutilización de la enzima β -Gal-3 de *B. Circulans* ATCC 31382 en reacciones de transglicosidación utilizando como aceptor GlcNAc en solo tampón o en presencia de S13 o [Bmim][PF₆] como co-solventes.

Cabe destacar, como se expuso en el apartado III.2.3.3, que el [Bmim][PF₆] no es soluble en agua y los azúcares no quedan disueltos en él, así que se puede separar del medio de reacción por centrifugación. Al someter a centrifugación la mezcla de reacción, se obtienen tres fases: una superior, compuesta por el tampón y los azúcares; una intermedia, compuesta por el soporte con la enzima inmovilizada; y una inferior, compuesta por el [Bmim][PF₆] (**Figura 59**). Esta separación permite retirar la fase acuosa con los productos de reacción, lavar el soporte con tampón y volver a añadir nueva mezcla de reacción, reutilizando tanto la enzima como el líquido iónico. Esta reutilización del co-solvente no es posible en las reacciones con el derivada de biomasa S13, ya que es soluble

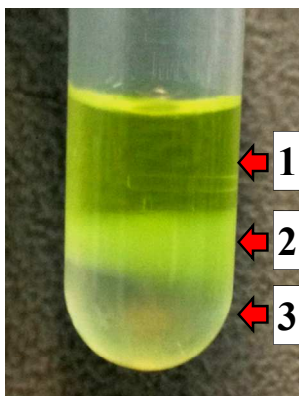


Figura 59. Separación de fases por centrifugación de reacción de transglucosidación utilizando β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa, *p*NF-gal como donador y GlcNAc como aceptor. 1) Fase acuosa. 2) Glioxil agarosa con enzima inmovilizada. 3) [Bmim][PF₆]

A la vista de los resultados obtenidos, el [Bmim][PF₆] se convierte en el candidato idóneo para ser utilizado como co-solvente en las reacciones de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 inmovilizada. Por un lado, con él se obtienen resultados de rendimiento muy elevados, 74% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc y 91% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc. Estos resultados de rendimiento son mayores al 60% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc- α -OBn o al 53% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc- α -OMe encontrados en la bibliografía en la que utilizaban la misma enzima (Naundorf y *col.* 1998), Además, alarga el número de reusos en los que el biocatalizador puede llevar a cabo la reacción, conservando ésta más de un 75 % de actividad después de reaccionar 10 veces; manteniendo más de un 65% de actividad después de 20 reusos, número en el que pierden completamente su actividad la enzima inmovilizada en medio con solo tampón o con S13; conserva alrededor del 50% de actividad después de 30 reusos y todavía mantiene el 30% después de 40. Por último, debido a que el co-solvente se puede separar de la mezcla de reacción, así como del soporte, el [Bmim][PF₆] puede ser reutilizado en todas las reacciones que se lleven a cabo con la enzima inmovilizada.

III.3. Capítulo 3: Síntesis de glicoconjugados mediante glicosintasas

Como se expuso en el apartado I.2.2 de la Introducción, la principal ventaja de las glicosintasas frente a las glicosidasas, a la hora de sintetizar disacáridos, radica en que su centro activo ha sido modificado de forma que no pueden realizar reacciones de hidrólisis. Por lo tanto, los productos de la reacción de síntesis no pueden ser hidrolizados por la enzima, como ocurre con las glicosidasas. Debido al potencial de estas enzimas, se decidió preparar diferentes glicosintasas para aplicarlas a la síntesis de glicoconjugados, y posteriormente, evaluar el efecto que los disolventes sostenibles ejercían sobre su actividad, estudio del que no hay descrito ningún trabajo hasta la fecha.

III.3.1. Mutagénesis dirigida de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 para la obtención de glicosintasas

Debido a los buenos resultados obtenidos con la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral, se decidió someterla a un proceso de mutagénesis dirigida, para así obtener su derivado glicosintasa y aprovechar las ventajas de este tipo de enzimas.

En el apartado III.2.4 del capítulo anterior se mostró el modelado molecular por homología de la enzima β -Gal-3 (**Figura 47**). La superposición del modelo de β -Gal-3 con la enzima LacZ de *E. coli* identificó en su centro activo, dos residuos de ácido glutámico encargados de la actividad catalítica de la enzima, el Glu-157 y el Glu-233 (**Figura 48**). A pesar de que la metodología para la transformación de glicosidasas en glicosintasas se basa en la mutagénesis del residuo nucleófilo (Glu-233 en β -Gal-3), se decidió mutar los dos glutámicos del centro activo (Glu-157 y Glu-233). De esta forma, además de la obtención de la glicosintasa de β -Gal-3, se podía confirmar la

predicción bioinformática y evaluar el efecto que tenía la modificación del centro activo sobre la actividad hidrolítica de la enzima nativa.

Cuando se publicó la mutagenesis de la β -glucosidasa de *Agrobacterium* sp., el aminoácido por el que se había mutado el residuo nucleófilo de su centro activo (Glu-358), fue la alanina, creándose el mutante E358A (Mackenzie y col. 1998). Posteriormente, los mismos autores probaron distintos aminoácidos en esa posición, observando también actividad glicosintasa cuando el glutámico era sustituido por serina (E358S) (Mayer y col. 2000), glicina (E358G) y cisteína (E358C) (Mayer y col. 2001). Los mejores resultados en cuanto a actividad sintética con estos mutantes fueron obtenidos con el E358G, siendo éste 102 veces más activo que el que mostraba actividad más baja, el E358C. A su vez, presentaba 51 veces más actividad que el mutante original E358A, y más del doble que E358S (Mayer y col. 2001). Estudiando la estructura tridimensional del mutante de la β -manosidasa de *Cellvibrio japonicus*, en el que se había sustituido el residuo nucleófilo por glicina, Jahn y col. concluyeron que la causa de que los resultados con este aminoácido fueran mejores que con serina, alanina o cisteína, se debía a que la glicina, al tener la cadena lateral más pequeña, dejaba un espacio libre mayor en el centro activo. Este espacio adicional era ocupado por moléculas de agua, que podían interaccionar con el carbono anomérico del donador, facilitando que se liberara el buen grupo saliente del carbono anomérico del donador (generalmente fluor) y favoreciendo la reacción de transglicosidación (Jahn y col. 2003). Debido a los buenos resultados previos utilizando glicina como sustituto del glutámico en el residuo nucleófilo, se eligió este aminoácido para crear los mutantes de la β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en sus posiciones Glu-157 y Glu-233, el β -Gal-3 E157G y el β -Gal-3 E233G (**Figura 60**).

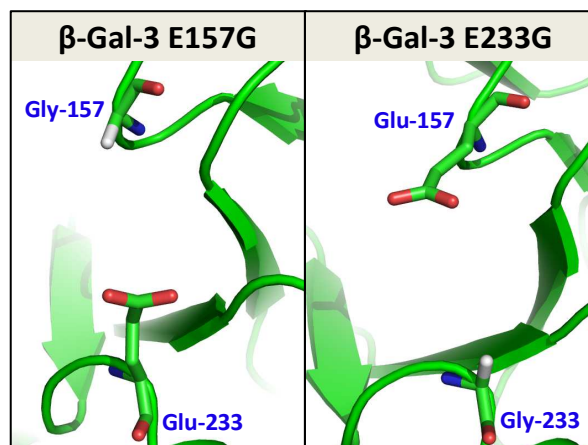


Figura 60. Modelado del centro activo de las enzimas mutantes β -Gal-3 E157 y G β -Gal-3 E233G.

Para la mutagénesis de los aminoácidos del centro activo se aplicó el protocolo Quick-Change (Stratagene). Este método se basa en la amplificación por PCR del plásmido que contiene el gen a mutar, utilizando para ello oligonucleótidos que incluyan en su secuencia la mutación deseada (apartado V.2.2.5). Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos, una para producir la proteína β -Gal-3 E157G (llamados B-gal-3-E157G-FW y B-gal-3-E157G-RV) y otra para la β -Gal-3 E233G (llamados B-gal-3-E233G-FW y B-gal-3-E233G-RV) (Tabla 30 del apartado V.1.3). Se llevaron a cabo las PCRs del protocolo Quick-Change (apartado V.2.2.5) y los plásmidos obtenidos se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α , bacteria cuya función es seleccionar y copiar los plásmidos recombinantes (apartado V.2.1.4.1). De las colonias crecidas se tomaron tres de cada una (E157G y E233G), de las que se extrajeron sus plásmidos y se secuenciaron (apartado V.2.2.6) para confirmar que la mutación se había introducido adecuadamente en el lugar deseado. En la Figura 61 se puede observar el resultado de la secuenciación de los plásmidos mutados, en los cuales, para cambiar el glutámico (tripletes GAG y GAA respectivamente) por glicina solo fue necesaria la sustitución de la adenina central por guanina en ambos casos, obteniéndose los tripletes GGG y GGA respectivamente (correspondientes a glicina). Posteriormente con ellos se transformaron células de *E. coli* BL21, cepa apropiada para la expresión de proteínas (apartado V.2.1.4.1).

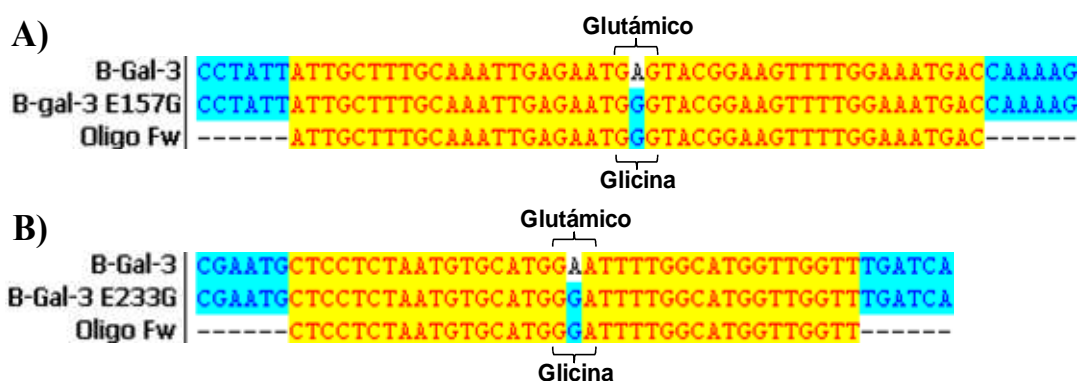
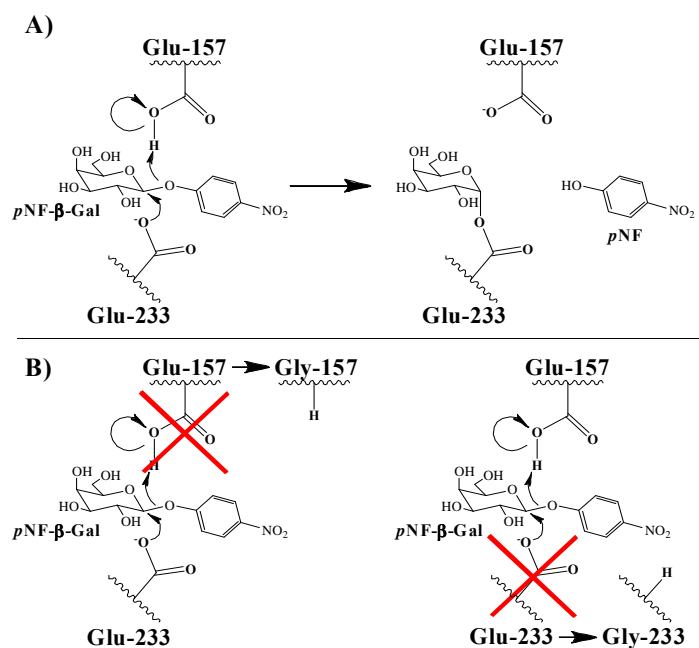


Figura 61. Alineamiento de las secuencias genéticas de la enzima β -Gal-3 nativa, la enzima β -Gal-3 mutante secuenciada y el oligonucleótido Fw utilizado para la PCR del protocolo Quick-Change. A) mutante E157G y B) mutante E233G

III.3.1.1. Síntesis de disacáridos utilizando las glicosintasas β -Gal-3 E157G y β -Gal-3 E233G

Para comprobar si las enzimas mutantes β -Gal-3 E157G y β -Gal-3 E233G mantenían su actividad nativa, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.2.4.1.2, utilizando como sustrato *p*NF- β -Gal. No se obtuvo actividad con ninguna de las dos enzimas, esto permitió confirmar empíricamente la predicción bioinformática del centro activo que se llevó a cabo el capítulo anterior (apartado III.2.4.2). Como se explico en el apartado I.2.1 de la Introducción, en el centro activo de las glicosidasas, ambos glutámicos participan en la formación del intermedio de reacción (**Esquema 17A**). La sustitución de alguno de estos residuos provoca la inactivación de la enzima (**Esquema 17B**).



Esquema 17. A) Formación del intermediario de reacción en el centro activo de la enzima β -Gal-3 de *B. Circulans* ATCC 31382 entre *p*NF- β -gal y el residuo nucleófilo (Glu-233). B) La sustitución de alguno de los residuos catalíticos del centro activo (Glu-157 o Glu-233) inactiva la enzima.

Una vez confirmada la pérdida de actividad hidrolítica de las enzimas mutantes β -Gal-3 E157G y β -Gal-3 E233G al sustituir los residuos catalíticos del centro activo, se procedió a caracterizar su actividad glicosintasa. Para ello se realizaron las reacciones de transglicosidación para la síntesis de disacáridos como se expone en el apartado V.2.4.2.4, utilizando como donador 1-desoxi-1-fluoro- α -D-galactopiranosido (Gal- β -F), ya que la presencia de un buen grupo saliente en el carbono anomérico del donador permite que se produzca la reacción de transglicosidación en glicosintasas, siendo ésta catalizada únicamente por el residuo ácido del centro activo, tal y como se explicó en el apartado I.2.2 de la Introducción. Como aceptores se utilizó una batería de azúcares compuesta por GlcNAc, GalNAc y *p*NF-GlcNAc. Las glicosintasas no suelen mantener las mismas condiciones óptimas de reacción que sus versiones nativas. Por un lado, se ha observado que un exceso de aceptor puede competir con el donador fluorado por la entrada al centro activo

(Cobucci-Ponzano, Strazzulli, y *col.* 2011), por otro, la sustitución del residuo nucleófilo puede causar la disminución del pKa del residuo ácido, que debe permanecer protonado para que se produzca la reacción (McIntosh y *col.* 1996). Por estos motivos, se utilizaron diferentes condiciones de reacción: tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM pH 4 y tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6, y con ambos tampones se utilizaron distintas relaciones de donador:aceptor, 1:1, 1:3 y 1:5. Se tomaron alícuotas de las reacciones a distintos tiempos (1, 8 y 24 h). En ninguna de las 18 reacciones con β -Gal-3 E157G ni en las 18 de β -Gal-3 E233G se obtuvo actividad.

Hidaka y *col.* postularon que para que se pudiera conseguir transformar una enzima glicosidasa en una glicosintasa activa, se debía cumplir el requisito fundamental de que en el espacio que quedaba al quitar el residuo nucleófilo en el centro activo, se debía situar una molécula de agua orientada de tal forma que interaccionara con el carbono anomérico del donador (Hidaka y *col.* 2010). Estos autores llegaron a la conclusión de que si la sustitución del residuo nucleófilo no permitía la entrada y orientación adecuada del agua en el centro activo, se deberían modificar otros aminoácidos cercanos al residuo nucleófilo para posibilitar que esto ocurriera. Esto es una posible explicación de la dificultad que supone crear glicosintasas activas, y es que de las 112 familias existentes de glicosidasas (Cantarel y *col.* 2009), los intentos para obtener sus respectivas mutantes glicosintasas hasta la fecha, solo han sido fructíferos para 17 de ellas (Cobucci-Ponzano y *col.* 2012). No se ha conseguido obtener ninguna glicosintasa de la familia GH35, a la que pertenece la β -Gal-3 de *B.circulans* ATCC 31382. La única enzima de la familia GH35 de la que se ha podido obtener un mutante activo ha sido la β -Galactosidasa de *Xanthomonas manihotis*, en la que se ha mutado su residuo ácido para la obtención de una tioglicoligasa, enzima que sintetiza análogos de disacáridos unidos por un átomo de azufre (Kim, Chen, y *col.* 2007).

III.3.2. Síntesis de disacáridos utilizando la enzima mutante TmGalA D327G-HisTag de *Thermotoga maritima* en presencia de disolventes sostenibles

El grupo del Dr. Marco Moracci ha desarrollado recientemente una glicosintasa activa derivada de la α -galactosidasa TmGalA de *Thermotoga maritima*, la TmGalA D327G, que es capaz de sintetizar glicoconjugados utilizando como donador una molécula de galactosa activada con un grupo azida en posición β (Gal- β -N₃) (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y col. 2011) Gracias a una colaboración con este grupo, se decidió estudiar el efecto de los disolventes sostenibles sobre esta nueva enzima.

III.3.2.1. Mutagénesis de las enzimas TmGalA y TmGalA D327G de *T. maritima* para la adición de colas de histidinas

La metodología utilizada hasta la fecha para la purificación de las enzimas de *T. maritima*, tanto la glicosidasa TmGalA como la glicosintasa TmGalA D327G, se basaba en columnas de intercambio iónico y de hidrofobicidad (Miller y col. 2001). El plásmido en el que se clonaron las enzimas, el pET24d(+) (Novagen), incluye la secuencia para añadir una cola de histidinas en la región C-terminal de la proteína. Esta cola no se aprovecha debido al codón Stop de la propia proteína, que termina el proceso de traducción justo al final del gen (**Figura 62**). Para añadir la secuencia de la cola de histidinas al final del gen no bastaría con retirar el triplete del codón Stop, puesto que, como se puede observar en la secuencia 1 de la **Figura 62**, la continuación de la traducción generaría una cola de treoninas (Thr) y no de histidinas (His). Por lo tanto, además de retirar el codón Stop de la secuencia, es necesario desplazar el marco de lectura para que se produzca la adecuada traducción de la cola de histidinas. Para conseguir estos dos objetivos en un solo paso, se llevó a cabo el protocolo Quick-Change de mutagénesis dirigida (apartado V.2.2.5 de Materiales y Métodos). Para esto se diseñaron los oligos para PCR TmGalA-HisTag (**Tabla 30** del apartado V.1.3 de Materiales y Métodos) que funcionaban de modo que al amplificar delecionaran las bases T y G del codón Stop, marcadas en amarillo en la

Figura 62. Esta deleción eliminaría el codón Stop y desplazaría el marco de lectura de la secuencia posterior, de modo que la cola de histidinas entrara en fase (secuencia 2 de la **Figura 62**).

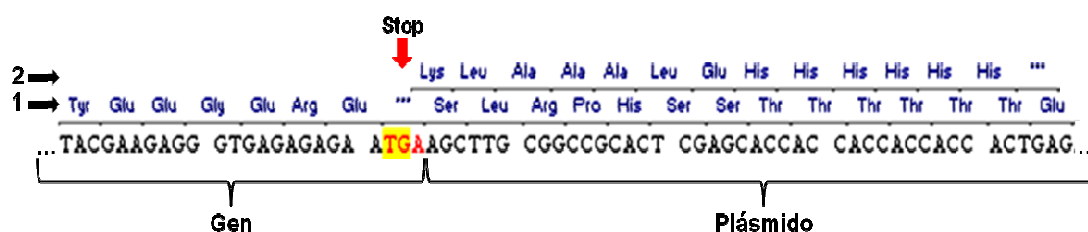


Figura 62. Parte final de la secuencia de los genes de las enzimas α -galactosidasa TmGalA y la α -glicosintasa TmGalA D327G de *T. Maritima* y zona de inserción en el plásmido pET24d(+). En rojo aparece el codón Stop del gen y en amarillo las bases delecionadas. 1) Es la secuencia de aminoácidos original. 2) Es la secuencia de aminoácidos después de la deleción de las dos bases marcadas en amarillo.

Se llevaron a cabo las PCRs del protocolo Quick-Change (apartado V.2.2.5) y los plásmidos obtenidos se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α para seleccionar y aumentar el número de plásmidos (apartado V.2.1.4.1). De las colonias crecidas se tomaron tres de cada una (TmGalA-HisTag y TmGalA D327G-HisTag), de las que se extrajeron sus plásmidos y se secuenciaron (apartados V.2.2.2 y V.2.2.6), para confirmar que la mutación se había introducido adecuadamente en el lugar deseado. En la **Figura 63** se muestra el alineamiento de las secuencias originales frente a la secuenciación de las mutadas para añadir la cola de histidina, y el oligonucleótido Fw que se utilizó en la PCR. En este alineamiento se puede observar que en ambas secuencias se han delecionado correctamente las dos bases necesarias. Con los plásmidos mutantes se transformaron células de *E. coli* BL21, cepa apropiada para la expresión de proteínas (apartado V.2.1.4.1). Posteriormente, se produjo la enzima y se purificó según los protocolos descritos en los apartados V.2.1.5 y V.2.3.4.

A-galactosidasa	ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA	TG	AAGCTTGCGGC	CGCACTT
A-galactosintasa	ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA	TG	AAGCTTGCGGC	CGCACTT
Oligo Fw	-----ACGAAGAGGGTGAGAGAGAA	---	AAGCTTGCGGC	-----
A-galactosidasa-HisTag	ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA	--	AAGCTTGCGGC	CGCACTT
A-galactosintasa-HisTag	ACTTCTACGAAGAGGGTGAGAGAGAA	--	AAGCTTGCGGC	CGCACTT

Figura 63. Alineamiento de las secuencias originales de las enzimas α -galactosidasa TmGalA y la α -galactosintasa TmGalA D327G de *T. Maritima* frente a las secuencias mutadas para añadir la cola de histidinas y el oligonucleótido Fw utilizado para la PCR.

III.3.2.2. Reacciones con la enzima TmGalA nativa de *T. maritima*

Para poder continuar con la caracterización de las enzimas, era importante confirmar, que la adición de la cola de histidinas en el extremo C-terminal no afectaba a la actividad. Para ello se llevó a cabo una producción de las enzimas TmGalA y TmGalA-HisTag, tal y como se describe en el apartado V.2.1.5. Finalizada la producción, se rompieron las células y se realizaron reacciones de hidrólisis con el extracto celular, tal y como se describe en los apartados V.2.1.6 y V.2.4.1.2. Las reacciones se llevaron a cabo a 65 °C, en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,5, utilizando *pNF- α -gal* 5 mM como sustrato. Los resultados mostraron que el extracto de la enzima TmGalA nativa presentaba una actividad de 45,4 UI/mg de proteína y la TmGalA-HisTag de 44,6 UI/mg de proteína, una diferencia inferior a una unidad que indica que la cola de histidina no afecta a la actividad. Los autores que clonaron por primera vez esta enzima obtuvieron una actividad de 48,2 UI/mg de proteína (Miller y *col.* 2001), resultado muy similar al obtenido en nuestro laboratorio.

Se midió la actividad glicosidasa de la enzima TmGalA-HisTag de *T. maritima* por el método continuo según el protocolo descrito en el apartado V.2.4.1.2, frente a una batería de sustratos hidrolizables, compuesta *pNF- α -Fuc*, *pNF- β -Fuc*, *pNF- α -Gal*, *pNF- β -Gal*, *pNF- α -Glu*, *pNF- β -Glu*, *pNF- α -Man*, *pNF- β -D-Man*, *pNF- α -GlcNAc* y *pNF- β -GlcNAc*, en tampón acetato de sodio 50 mM pH5,5, a 65 °C durante 10 min. Los resultados se muestran en la **Tabla 24**. Como se puede ver, solo se ha obtenido actividad hidrolítica cuando se usa como sustrato el *pNF- α -Gal* (216,3 UI/mg), lo

que se corresponde con lo expuesto en la bibliografía, realizando las reacciones en las mismas condiciones (Miller y *col.* 2001).

Tabla 24. Resultados del screening de actividades glicosidasa con la enzima TmGalA-HisTag de *T. maritima*. Resultados mostrados en UI/mg.

pNF-	β-Fuc	α-Fuc	β-Glu	α-Glu	β-Gal	α-Gal	β-Man	α-Man	β-GlcNAc	α-GlcNAc
TmGalA-HisTag	-	-	-	-	-	216,3	-	-	-	-

Una vez confirmado que la enzima solo es activa frente pNF-α-Gal, se procedió a usar este compuesto como donador para realizar un cribado para detectar su posible actividad de transglicosidación frente a una batería de aceptores compuesta por Glu, Man, Gal, Fuc, Fru, GalNAc, GlucNAc, pNF-α-fuc, pNF-β-fuc, pNF-α-gal, pNF-β-gal, pNF-β-glu, pNF-α-man, pNF-β-D-man, pNF-β-GalNAc y pNF-β-GlcNAc, tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2, en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,5, a 65 °C y tomando alícuotas a 1, 5 y 18h. La enzima TmGalA no es capaz de llevar a cabo reacciones de transglicosidación con ninguno de los sustratos utilizados. Esto era lo esperado según lo consultado en la bibliografía, y de ahí la importancia de la capacidad sintética de su versión mutante glicosintasa, la TmGalA D327G (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011).

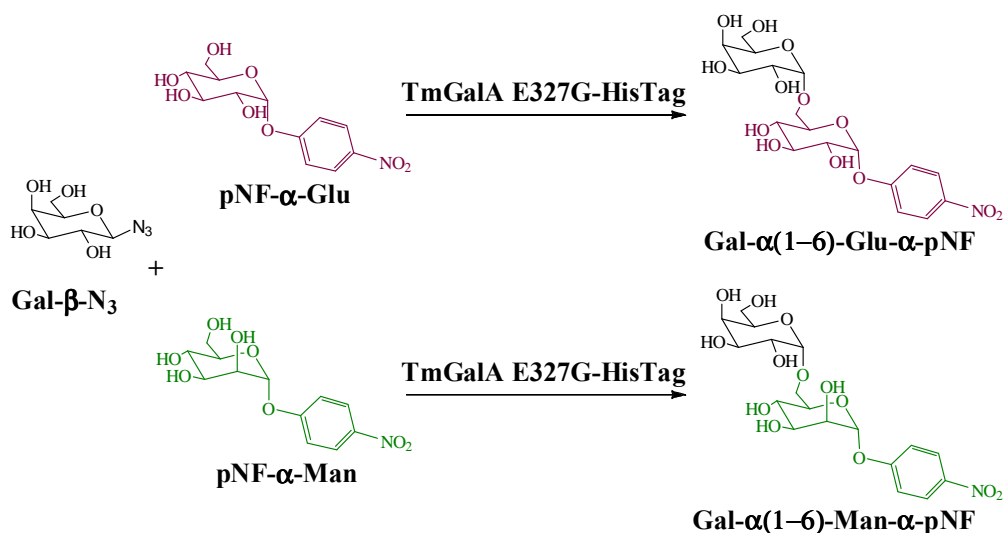
III.3.2.3. Reacciones de transglicosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag de *T. maritima*

La enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag obtenida de la mutagénesis de TmGalA de *T. maritima* sintetiza disacáridos utilizando como donador Gal-β-N₃ (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011). Se utilizó este compuesto como donador (14 mM) frente a una batería de aceptores (14 mM) para la reacción de transglicosidación con la enzima TmGalA D327G-HisTag, según el protocolo del apartado V.2.4.2.4, en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,5, a 65 °C durante 18 h. Las reacciones fueron seguidas por HPLC (apartado V.2.7.1). Los resultados se

muestran en la Tabla 25, en la que se puede observar que los sustratos reconocidos como aceptores son el *pNF- α -Glu* y el *pNF- α -Man* para la síntesis de *Gal- α (1-6)-Glu- α -*pNF* y *Gal- α (1-6)-Man- α -*pNF* respectivamente (Esquema 18), resultados que se corresponden con los obtenidos por el grupo del Dr. Moracci (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011).**

Tabla 25. Reacciones de transglicosidación con la enzima TmGalA D327G-HisTag de *T. Maritima* utilizando Gal- β -N₃ 14mM como donador y una batería de mososacáridos como aceptores en concentración 14mM relación en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,5, a 65 °C durante 18h.

Donador: Gal- β -N ₃			
Aceptores			
Glucosa	-	<i>pNF-β-fuc</i>	-
Manosa	-	<i>pNF-α-gal</i>	-
Galactosa	-	<i>pNF-β-gal</i>	-
Fucosa	-	<i>pNF-α-glu</i>	+
Fructosa	-	<i>pNF-β-glu</i>	-
Galactosamina	-	<i>pNF-α-man</i>	+
GalNAc	-	<i>pNF- β -man</i>	-
GlcNAc	-	<i>pNF-β-GalNAc</i>	-
<i>pNF-α-fuc</i>	-	<i>pNF-β-GlcNAc</i>	-



Esquema 18. Reacción de trasglucosidación catalizada por la enzima TmGalA D327G-HisTag de *T. Maritima* utilizando como donador Gal-β-N₃ y como aceptores pNF-α-Glu y el pNF-α-Man, para la síntesis de Gal-α(1-6)-Glu-α-pNF y Gal-α(1-6)-Man-α-pNF.

Para confirmar sintetiza los disacáridos α(1-6) que describe la bibliografía (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y col. 2011), los productos puros deben ser caracterizados por RMN (apartado V.2.7.2). Además, para poder cuantificar los rendimientos de reacción es necesario preparar rectas de calibrado que relacionen el área detectada en el HPLC con la concentración de muestra (apartado V.2.7.1). Por todo esto, el primer paso fue obtener los productos purificados.

Se llevaron a cabo dos reacciones en un volumen de 35 ml según las condiciones descritas en el apartado V.2.4.2.4. Se utilizaron como donador Gal-β-N₃ (14 mM), y como aceptor en un caso pNF-α-Glu y en otro pNF-α-Man 14 mM (relación donador:aceptor 1:1). Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1. **Figura 64**). Para calcular rendimientos de reacción, el porcentaje de hidrólisis del sustrato (galactosa producida) se obtendrá de la diferencia entre sustrato limitante sin consumir (Gal-β-N₃) y disacárido producido.

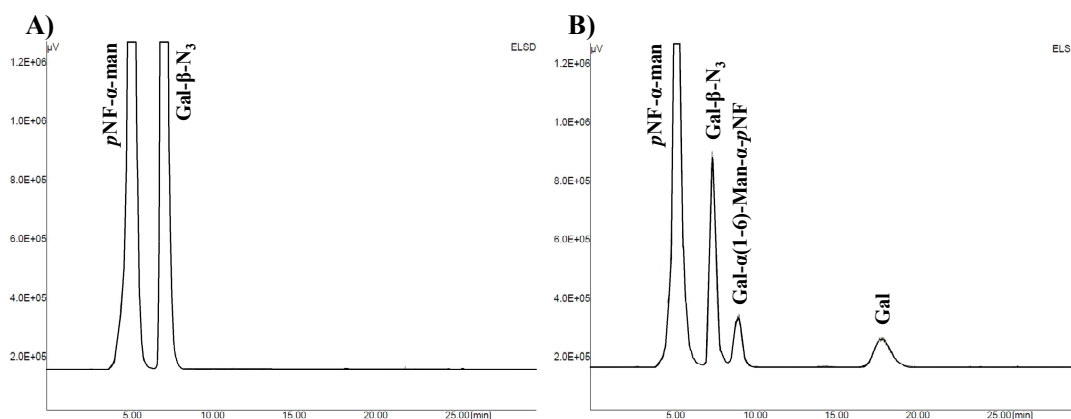


Figura 64. Cromatogramas de HPLC-ELSD de la reacción de transglicosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,5 utilizando Gal-β-N₃ como donador y pNF-α-man como aceptor en relación 1:1. A) Tiempo 0h y B) Tiempo 18h.

Finalizada la reacción, transcurridas 18 h, esta fue detenida añadiendo 9 volúmenes de metanol, ya que al tratarse de una enzima termófila, la reacción no puede ser detenida por choque térmico. La mezcla de reacción fue filtrada, el metanol recuperado en rotavapor y la mezcla liofilizada (apartado V.2.5.7). La purificación se llevó a cabo en una columna de sílica gel. La fase móvil empleada en esta cromatografía estaba compuesta por acetato de etilo:metanol:agua en relación 70:20:10, tal y como se describe en el apartado. Los compuestos a separar presentes en el crudo de reacción eran: los monosacáridos (Gal-β-N₃, Gal y pNF-α-Glu en un caso o pNF-α-Man en otro) y el disacárido producto, Gal-α(1-6)-Glu-α-pNF o Gal-α(1-6)-Man-α-pNF. En la Figura 65 se muestra la separación de los crudos de reacción por TLC (apartado V.2.5.4, Figura 65A) y el seguimiento de la purificación (Figura 65B).

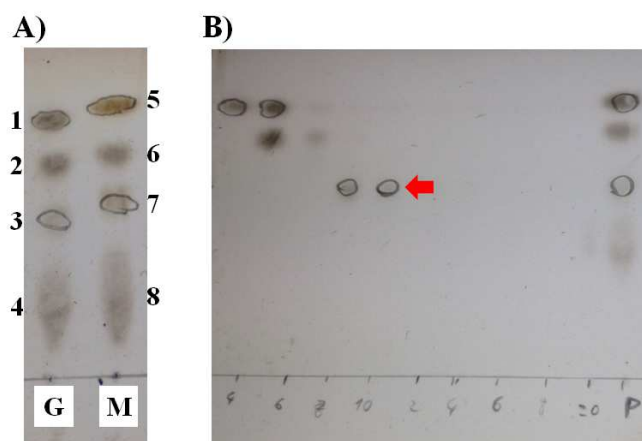


Figura 65. TLC de la reacción de la transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G utilizando como donador Gal- β -N₃ y como fase móvil acetato de etilo:metanol:agua en relación 70:20:10. A) Separación de los crudos de reacción donde „G“ se corresponde con la reacción con *p*NF- α -Glu como aceptor en la que 1 es *p*NF- α -Glu, 2 es Gal- β -N₃, 3 es Gal- α (1-6)-Glu- α -*p*NF y 4 es Gal. „M“ se corresponde con la reacción con *p*NF- α -Man como aceptor en la que 5 es *p*NF- α -Man, 6 es Gal- β -N₃, 7 es Gal- α (1-6)-Man- α -*p*NF y 8 es Gal. B) Diferentes tubos recolectados de la cromatografía en columna de sílica gel de la reacción con *p*NF- α -Glu como aceptor. La flecha roja marca el disacárido Gal- α (1-6)-Glu- α -*p*NF.

Las fracciones que contenían los disacáridos purificados se llevaron a sequedad en rotavapor y se analizaron por RMN (apartado V.2.7.2), lo que confirmó la identidad y pureza de los disacáridos sintetizados y permitió además preparar rectas de calibrado para medir su concentración por HPLC (apartado V.2.7.1).

Gal- α (1-6)-Glu- α -pNP (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y col. 2011). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 5.87 (d, 1H, $J_{H-1,H-2}$ = 3.6 Hz, H-1A), 4.88 (d, 1H, $J_{H-1,H-2}$ = 3.7 Hz, H-1B), 3.95 (t, 1H, H-3A), 3.93 (d, 1H, H-4B), 3.90 (t, 1H, H-5A), 3.87 (d, 1H, H-6aA), 3.87 (d, 1H, H-5B), 3.82 (dd, 1H, H-2A), 3.75 (d, 1H, H-6aB), 3.74 (d, 1H, H-2B), 3.72 (d, 1H, H-6bB), 3.71 (d, 1H, H-6bA), 3.58 (dd, 1H, H-3B), 3.56 (t, 1H, H-4A); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ 99.2 (C-1B), 97.7 (C-1A), 74.5 (C-3A), 73.2 (C-5B), 72.2 (C-2A), 72.2 (C-5A), 70.8 (C-4A), 70.8 (C-3B), 70.5 (C-4B), 69.6 (C-2B), 66.9 (C-6A), 62.4 (C-6B).

Gal- α (1-6)-Man- α -pNP(Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y col. 2011). ^1H NMR (500 MHz, D₂O): δ 5.87 (bs, 1H, H-1A), 4.95 (d, 1H, $J_{\text{H-1,H-2}} = 3.8$ Hz, H-1B), 4.30 (dd, 1H, H-2A), 4.14 (dd, 1H, H-3A), 4.00 (d, 1H, H-4B), 3.98 (t, 1H, H-5A), 3.97 (dd, 1H, H-6aA), 3.90 (t, 1H, H-5B), 3.89 (t, 1H, H-4A), 3.82 (dd, 1H, H-6aB), 3.81 (dd, 1H, H-2B), 3.78 (dd, 1H, H-6bB), 3.74 (dd, 1H, H-6bA), 3.66 (dd, 1H, H-3B); ^{13}C NMR (125 MHz, D₂O): δ 99.3 (C-1B), 99.2 (C-1A), 73.8 (C-5B), 72.3 (C-5A), 72.0 (C-3A), 71.1 (C-2A), 71.0 (C-3B), 70.6 (C-4B), 69.8 (C-2B), 68.0 (C-4A), 67.0 (C-6A), 62.4 (C-6B).

III.3.2.3.1. Reacciones de transglucosidación en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa

Para medir su efecto sobre la actividad de la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag se utilizaron como co-solventes los derivados de biomasa descritos en el apartado III.2.3.1, cuyas estructuras aparecen en el

Esquema 15 y sus características físico-químicas en la Tabla 20 de ese apartado. Las reacciones se llevaron a cabo según las condiciones descritas en el apartado V.2.4.2.4, en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 y 2M de disolvente sostenible, a 65 °C durante 18 h, con Gal- β -N₃ como donador. Los resultados de las reacciones usando pNF- α -Glu como aceptor se muestran en la **Figura 66** y los de las reacciones usando pNF- α -Man en la **Figura 67**.

En la **Figura 66** se pueden observar los resultados de la reacción de transglucosidación, cuando se utiliza pNF- α -Glu como aceptor para la síntesis de Gal- α (1-6)-Glu- α -pNF en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa. En la reacción control, se produjo una conversión del 55% de Gal- β -N₃, quedando un 45% de este sustrato sin reaccionar, obteniéndose un rendimiento del 35% de disacárido y un 20% de hidrólisis (Gal). Prácticamente todos los derivados de biomasa inhibieron la actividad enzimática, evitando que se produjera la reacción. Con S9, S11, S12 y S15 se produjo reacción, pero con rendimientos en la síntesis de disacárido inferiores a los obtenidos en la reacción solo con tampón (14, 4, 19, Y

15% respectivamente). En la reacción con S8 se mejora la conversión, ya que permanece sin reaccionar el 27% de Gal- β -N₃, comparado con el 45% de la reacción de la reacción control en tampón. Este aumento de conversión se traduce en un aumento de la hidrólisis, ya que pasa del 20% de la reacción control al 36% obtenido en S8, permaneciendo el rendimiento de síntesis de disacárido prácticamente constante (pasando de un 35 a un 37%).

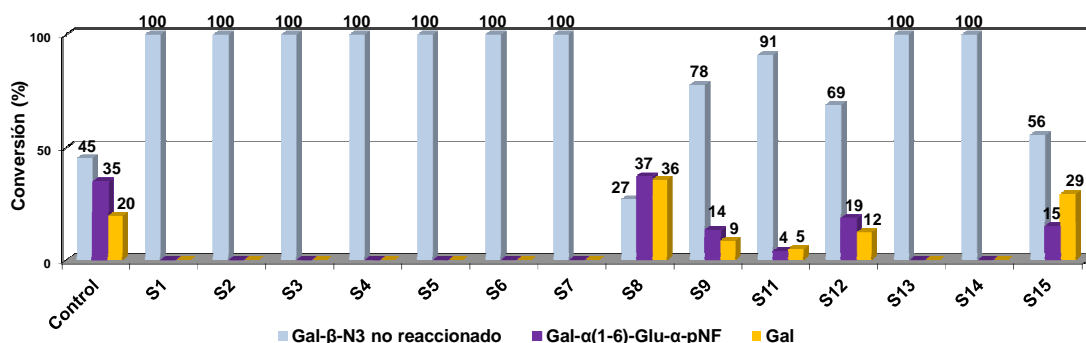


Figura 66. Reacciones de transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag utilizando como donador Gal- β -N₃, como aceptor pNF- α -Glu y como co-colventes una batería de disolventes sostenibles derivados de biomasa.

En la **Figura 67** se muestran los resultados obtenidos en la reacción de transglucosidación cuando se utiliza pNF- α -Man como aceptor, para la síntesis de Gal- α (1-6)-Man- α -pNF en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa. En la reacción control, solo con tampón, se produjo una conversión de sustrato del 57%, quedando un 43% de Gal- β -N₃ sin reaccionar. El rendimiento de disacárido fue del 25%, frente a un 32% de hidrólisis (Gal). En las reacciones con derivados de biomasa como co-solventes, se obtuvieron unos resultados muy similares a aquellos en los que se utilizó pNF- α -Glu como aceptor. Casi todos los derivados de biomasa inhiben la actividad enzimática. Con S9, S11, y S12 se produjo reacción, pero con rendimientos en la síntesis de disacárido inferiores a los obtenidos en la reacción solo con tampón (1, 2 y 12% respectivamente). S15 es el que mayor conversión de sustrato muestra (21% frente al 43% de la reacción control), pero el

rendimiento de síntesis de disacárido es menor (15% frente a 25%), con un gran aumento en la hidrólisis (64% frente al 32% del control). S8 muestra unos resultados muy parecidos a los del control, con algo más de conversión de sustrato de partida (66% frente a 57%), pero con un aumento por igual de síntesis de disacárido y de hidrólisis (30 y 36% respectivamente frente a 25 y 32% del control).

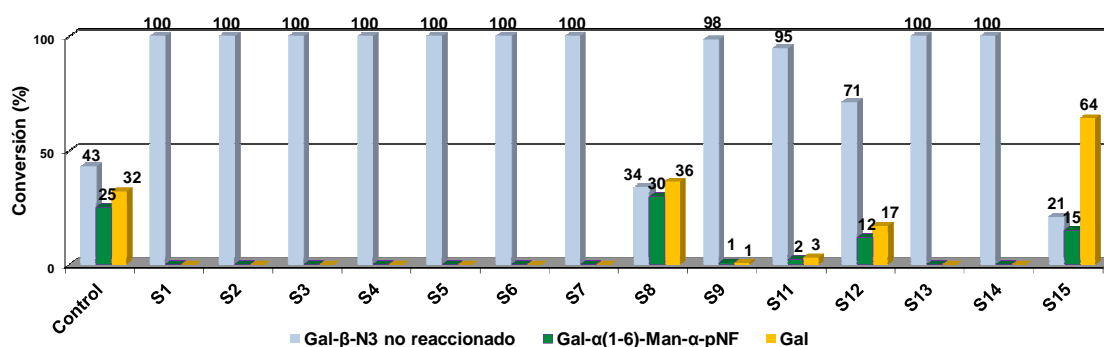


Figura 67. Reacciones de transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag utilizando como donador Gal-β-N₃, como aceptor *p*NF-α-Man y como co-solventes una batería de disolventes sostenibles derivados de biomasa.

Los resultados de las reacciones con ambos aceptores demuestran que los disolventes sostenibles derivados de biomasa utilizados como co-solventes, no solo no mejoran la síntesis de disacáridos, sino que en la mayoría de los casos inhiben la actividad enzimática, reduciendo la conversión hasta el punto de hacer que la reacción no se produzca en absoluto. Como ya se ha explicado previamente en el capítulo III.2, los co-solventes modifican la estructura terciaria de las enzimas y modifican las características físico-químicas del medio de reacción. A la vista de los resultados obtenidos, los derivados de biomasa afectan a la estructura de la enzima de forma que se inhibe la reacción en la mayoría de los casos, por lo que no son buenos co-solventes para las reacciones con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag y por ello no se profundizó más en su estudio.

III.3.2.3.2. Reacciones de transglicosidación en presencia de líquidos iónicos

Al igual que en el punto anterior con los derivados de biomasa, se utilizaron LIs como co-solventes para medir su efecto sobre la actividad de la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag. Estos LIs fueron descritos en el apartado III.2.3.2, cuyas estructuras aparecen en el **Esquema 16** y sus características físico-químicas en la Tabla 21 de dicho apartado. Las reacciones se llevaron a cabo según las condiciones descritas en el apartado V.2.4.2.4, en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 y 30% de LI, a 65 °C durante 18 h, con Gal- β -N₃ como donador. Los resultados de las reacciones usando *p*NF- α -Glu como aceptor se muestran en la **Figura 68** y los de las reacciones usando *p*NF- α -Man en la **Figura 69**.

En la **Figura 68** se pueden observar los resultados de la reacción de transglicosidación, cuando se utiliza *p*NF- α -Glu como aceptor para la síntesis de Gal- α (1-6)-Glu- α -*p*NF en presencia de LIs. En la reacción control se produjo una conversión del 55% de Gal- β -N₃, quedando un 45% de este sustrato sin reaccionar y se obtuvo un rendimiento del 35% de disacárido y un 20% de hidrólisis (Gal). En ningún caso se ha producido la total inhibición de la actividad enzimática. En las reacciones con [Bmim][BF₄], [Bmim][PF₆], [Bmim][MeSO₄], [Emim][BF₄], [Hmim][Ntf₂] y [Omim][PF₆] se obtuvo un rendimiento en la síntesis de disacárido inferior al obtenido en la reacción control sin IL (7, 15, 7, 16, 20 y 25% respectivamente). En los casos concretos de [Bmim][PF₆] y [Emim][BF₄] se observa que la conversión de sustrato de partida es mucho mayor que en el control (93 y 89% respectivamente frente al 55% de la reacción control), pero este aumento en la conversión solo favorece la hidrólisis, siendo la producción de Gal del 78 y 73% respectivamente. En el caso de [Bmim][Ntf₂] y [Emim][MeSO₄] se obtiene un resultado de rendimiento de disacárido casi idéntico al de la reacción control (34 y 37% respectivamente), llamando la atención en el segundo como la hidrólisis ha sido reducida al 7% frente al 20% del control. Con [Bmim][FAP] el rendimiento de producción de disacárido aumenta hasta el 43%, obteniéndose el mejor resultado con

[Troma][Ntf₂] en el que la conversión de sustrato es casi total y se obtiene un rendimiento de síntesis de Gal- α (1-6)-Glu- α -pNF del 49%.

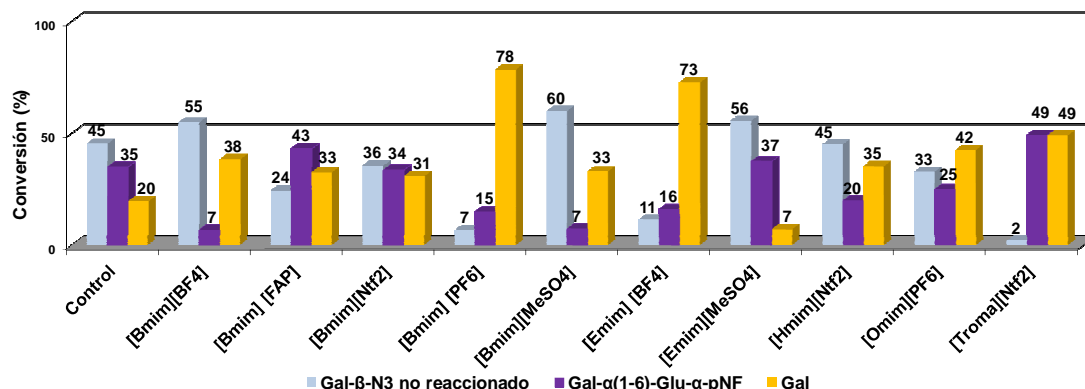


Figura 68. Reacciones de transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag utilizando como donador Gal-β-N₃, como aceptor pNF-α-Glu y como co-colventes una batería de líquidos iónicos.

En la **Figura 69** se muestran los resultados obtenidos en la reacción de transglucosidación, cuando se utiliza pNF-α-Man como aceptor para la síntesis de Gal-α(1-6)-Man-α-pNF en presencia de LIs. En la reacción control, solo con tampón, se produjo una conversión de sustrato del 57%, quedando un 43% de Gal-β-N₃ sin reaccionar. El rendimiento de disacárido fue del 25%, frente a un 32% de hidrólisis (Gal). Los LIs [Bmim][BF₄], [Bmim][MeSO₄] y [Omim][PF₆] inhiben parte de la actividad enzimática, puesto que permanece un 92%, un 66% y un 82% respectivamente de sustrato Gal-β-N₃ sin reaccionar y apenas presentan síntesis de disacárido. [Bmim][FAP], [Bmim][Ntf₂], [Bmim][PF₆] y [Hmim][Ntf₂] muestran un rendimiento en la síntesis de disacárido muy parecido al encontrado en la reacción control (23, 28, 32 y 23% respectivamente) aunque con mayor tendencia hacia la hidrólisis. [Emim][BF₄] cambia la regioselectividad de la enzima hacia la hidrólisis en detrimento de la transglucosidación, de la que se obtuvo un 14%. Lo contrario ocurre con [Emim][MeSO₄], que aun mostrando una conversión de sustrato inicial similar a la del control, disminuye la tendencia hacia la hidrólisis, aumentando la síntesis de disacárido hasta el 45% (frente al 25% del control). El mejor resultado se

obtuvo con el IL [Troma][Ntf₂], que potencia la conversión del sustrato de partida hasta hacerlo casi desaparecer (3%) orientando la regioselectividad hacia la transglucosidación, obteniéndose con este IL un 80% de Gal- α (1-6)-Man- α -pNF.

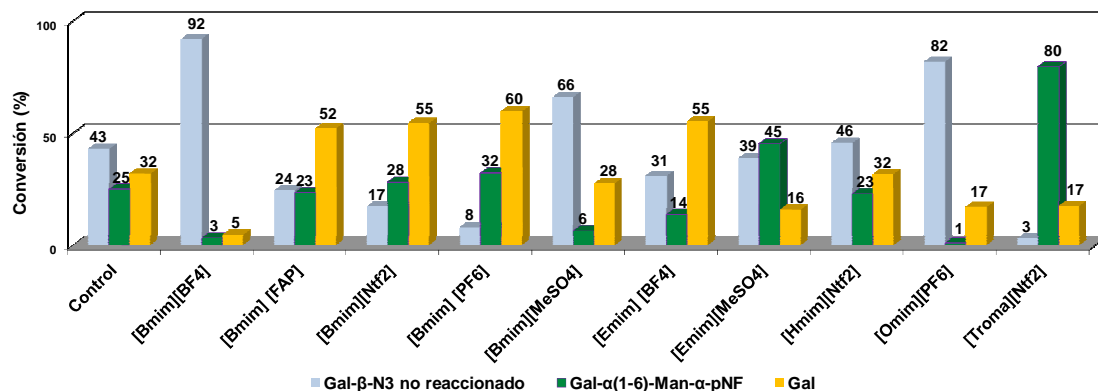


Figura 69. Reacciones de transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag utilizando como donador Gal-β-N₃, como aceptor pNF-α-Man y como co-solventes una batería de líquidos iónicos

El IL [Troma] [Ntf₂] demostró ser el co-solvente más apropiado para usar en las reacciones de transglucosidación con la enzima glicosintasa TmGalA D327G, no solo porque potenciaba la conversión hasta la casi total desaparición del sustrato, sino porque aumentaba el rendimiento de producción de disacáridos respecto a la reacción solo con tampón, tanto en la reacción con pNF-α-Glu como aceptor, como en la reacción con pNF-α-Man, hasta el 49 y 80 % respectivamente. Por esto, se seleccionó este co-solvente para observar la evolución de la reacción a lo largo del tiempo, hasta las 36 h. Para ello se llevaron a cabo las reacciones tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.4, en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 a 65 °C. Se utilizó Gal-β-N₃ como donador y pNF-α-Glu o pNF-α-Man como aceptores, para la síntesis de Gal-α(1-6)-Glu-α-pNF y Gal-α(1-6)-Man-α-pNF. Se añadió un 30% de [Troma] [Ntf₂] y se tomaron alícuotas a 18, 24 y 36 h, siguiendo las reacciones por HPLC (apartado V.2.7.1). Los resultados se muestran en la Figura 70, en la que se puede observar que una vez finalizada la reacción a las 18h, la

concentración de disacárido sintetizado permanece constante con el paso del tiempo, hasta las 36h.

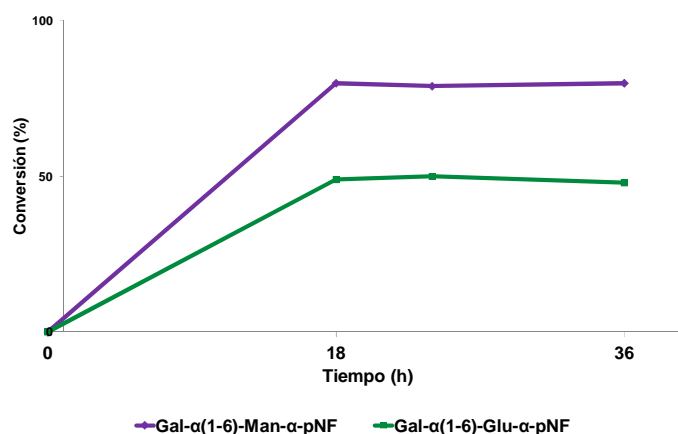


Figura 70. Evolución la concentración de disacáridos sintetizados por la enzima glicosintasa TmGalA D327G-HisTag una vez finalizada la reacción midiendo a las 18, 24 y 36 h. En morado aparece Gal-α(1-6)-Glu-α-pNF y en verde Gal-α(1-6)-Man-α-pNF.

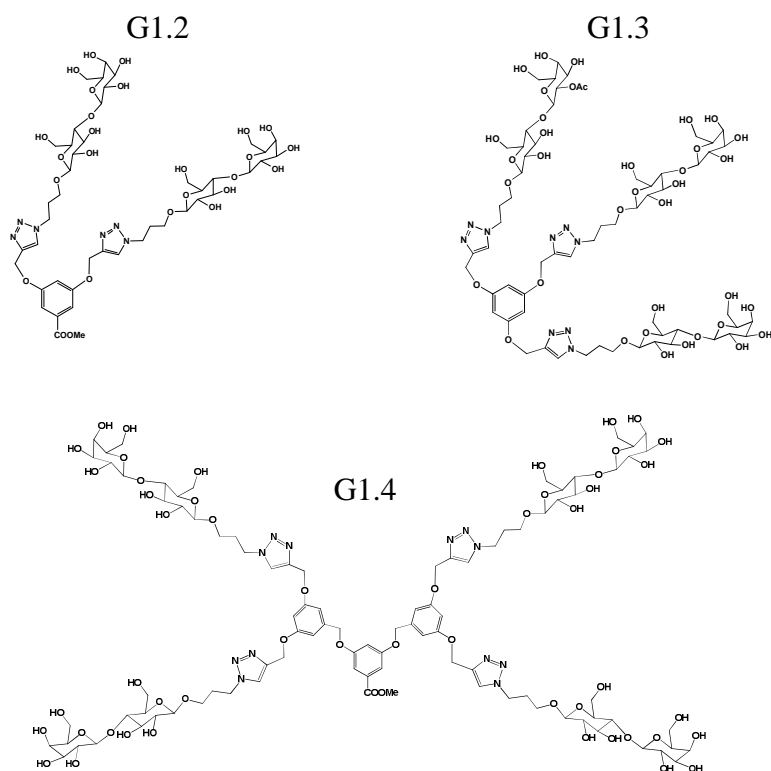
La tecnología de glicosintasas puede conseguir que una enzima glicosidasa que no muestra actividad transglicosidasa sintetice disacáridos, como en el caso de la α -galactosidasa de TmGalA de *T. maritima* (Cobucci-Ponzano, Zorzetti, y *col.* 2011). Además, la incapacidad de las glicosintasas para hidrolizar el producto de la transglicosidación es una ventaja respecto a las glicosidasas, ya que se evita la pérdida de producto final una vez terminada la reacción, pero el inconveniente de muchas glicosintasas es su bajo rendimiento hacia la síntesis (Cobucci-Ponzano y *col.* 2012). Los estudios llevados a cabo en este capítulo concluyen que el uso de co-solventes apropiados puede aumentar la actividad enzimática y el rendimiento en síntesis de las enzimas glicosintasa, lo que unido a la ausencia de hidrólisis del producto puede aumentar el interés de estas enzimas aplicadas a bioprocesos, como por ejemplo el acoplamiento en tándem con otras enzimas (Oroz-Guinea y *col.*) o el escalado a nivel industrial.

III.4. Capítulo 4. Funcionalización de glicodendrimeros mediante sialiltransferasas

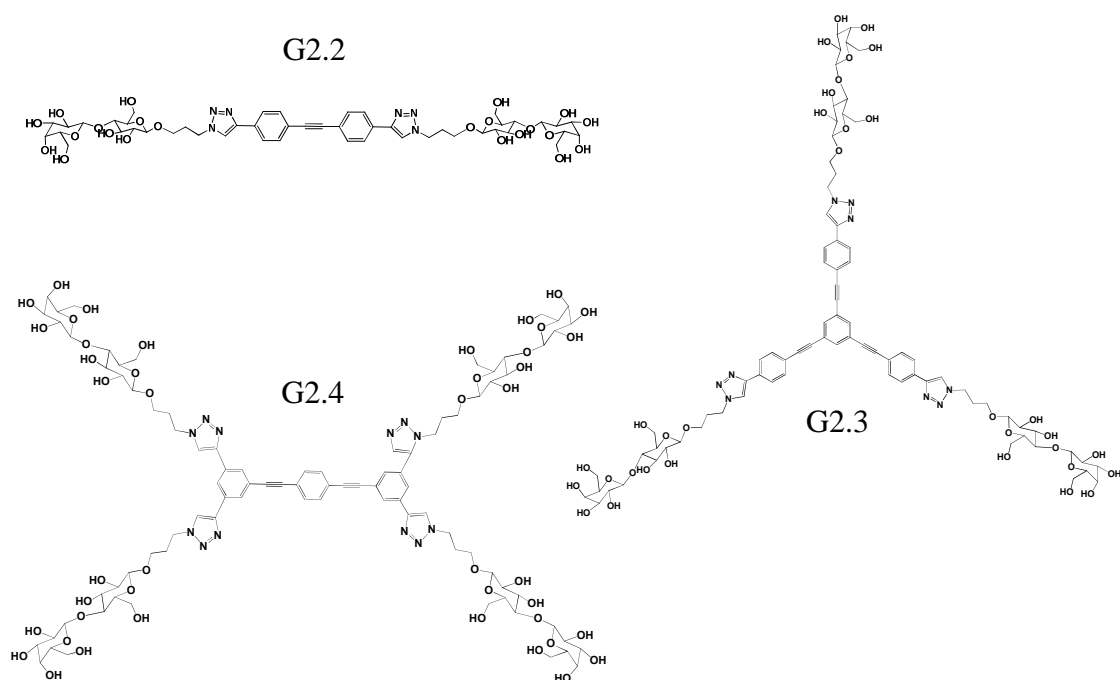
Las moléculas multivalentes, como los glicodendrimeros, pueden simular las interacciones de las estructuras biológicas (Krishnamurthy y *col.* 2006), lo que presenta una gran utilidad para el estudio de procesos de interacciones biológicas (Boas y *col.* 2004) (apartado I.1.2 de la Introducción). Por otro lado, los ácidos siálicos, como en Neu5Ac y Neu5Gc, son el tipo de azúcares que se localiza más frecuentemente en el extremo terminal de las cadenas glucídicas de los glicoconjugados de la superficie celular en sistemas eucariotas y procariotas, y por lo tanto, su participación en procesos de reconocimiento e interacción es vital (Schauer 1982; Chen y *col.* 2010) (apartado I.1.1 de la Introducción).

Gracias a una colaboración con el Dr. Woody Fessner, se utilizaron dos tipos de enzimas sialiltransferasa, la α -2,6-sialiltransferasa (α 2,6SiaT) de *Photobacterium leiognathi* (Yamamoto y *col.* 2007) y la α -2,3-sialiltransferasa (α 2,3SiaT) de *Photobacterium phosphoreum* (Tsukamoto y *col.* 2007), desarrolladas en su laboratorio, para unir los derivados de ácido siálico Neu5Ac y Neu5Gc a la galactosa terminal de glicodendrimeros sintetizados por nuestro grupo de investigación (apartado V.2.4.3.2.4). El objetivo de esta funcionalización era el estudio de interacciones carbohidrato-proteína, para poder evaluar la eficacia de la presentación multivalente de los distintos productos obtenidos.

Se han utilizado dos tipos diferentes de glicodendrimeros con distinto grado de funcionalización: los G1, de carácter hidrófilo (Esquema 19) y los G2, de carácter más hidrofóbico y con grupos cromóforos (Esquema 20).



Esquema 19. Estructuras de los glicodendrimeros de tipo G1.



Esquema 20. Estructuras de los glicodendrimeros de tipo G2.

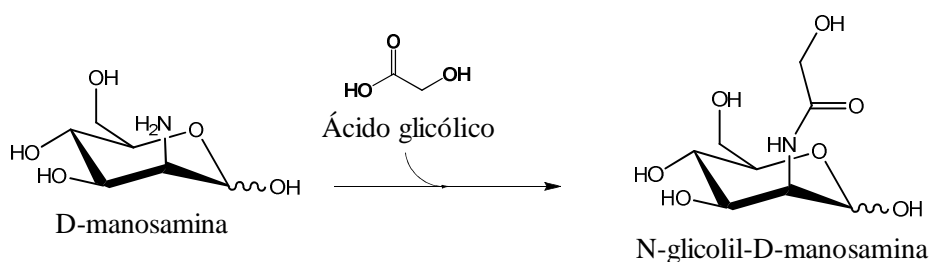
III.4.1. Síntesis de los sialoconjugados Neu5Ac-CMP y Neu5Gc-CMP

Antes de la funcionalización de los glicodendímeros (Esquema 19 y Esquema 20), se procedió a la activación de los ácidos siálicos con citidin monofosfato (CMP), para que fueran sustratos reconocibles por las sialiltransferasas. Pero previamente, fue necesario sintetizar el siálico Neu5Gc, puesto que no era un sustrato comercial.

III.4.1.1. Síntesis químico-enzimática de Neu5Gc

El proceso de síntesis de Neu5Gc partió de la D-manosamina y pasó por dos etapas: la primera, de síntesis química, para la obtención de *N*-glicolil-D-Manosamina, y la segunda, de síntesis enzimática, para la final obtención del Neu5Gc. La metodología aplicada fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Fessner (*He y col. 2011*).

Para la síntesis química de *N*-glicolil-D-Manosamina, se llevó a cabo la reacción descrita en el apartado V.2.4.3.2.1.1, en la que se utilizaron hidrocloreuro de D-manosamina y ácido glicólico como sustratos, en presencia de trietilamina y con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y *N,N'*-Diisopropil carbodiimida (DIC) como catalizadores, todo disuelto en *N,N*-dimetilformamida anhidra (DMF), en atmosfera inerte de argón, con agitación magnética y temperatura ambiente (**Esquema 21**)



Esquema 21. Síntesis química de *N*-glicolil-D-Manosamina a partir de D-manosamina.

El seguimiento de la reacción se realizó mediante TLC (**Figura 71**), utilizando como fase móvil cloroformo:metanol en relación 2:1. Finalizada la reacción el crudo fue filtrado, concentrado en rotavapor y purificado en una columna de sílica gel (apartado V.2.5.5) con la misma fase móvil utilizada anteriormente en la TLC. Para retirar toda la trietilamina posible de la muestra purificada, se utilizó una columna de intercambio catiónico, como se describe en el apartado V.2.5.3. El compuesto fue caracterizado por RMN (apartado V.2.7.2). Se obtuvo un rendimiento en la reacción del 72%.

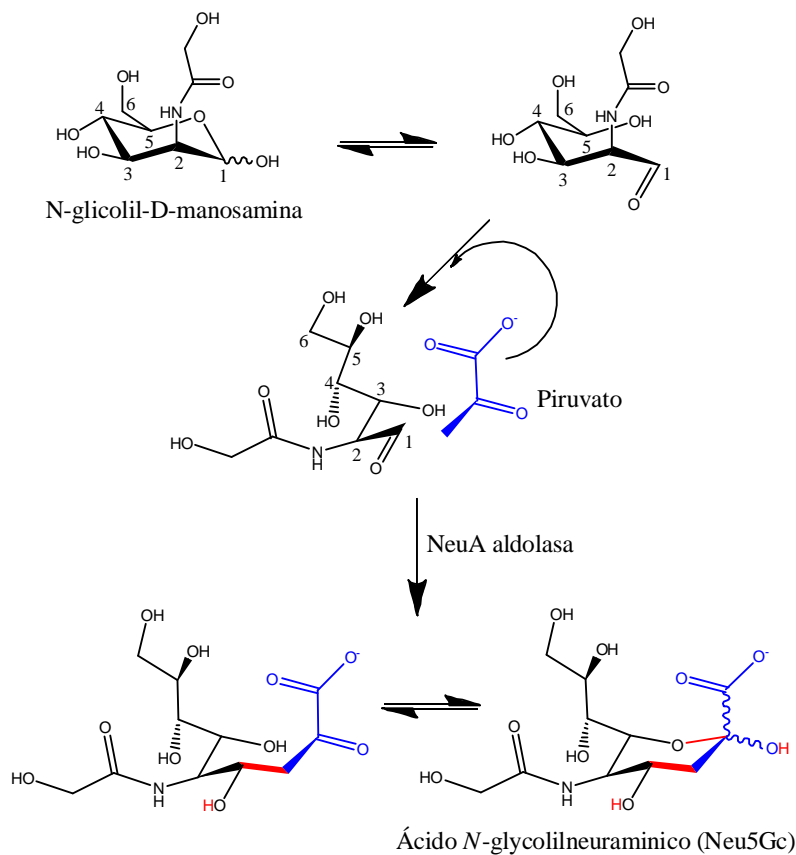


Figura 71. TLC de la reacción de síntesis de *N*-glicolil-D-Manosamina utilizando como fase móvil cloroformo:metanol en relación 2:1.

***N*-glicolil-D-Manosamina:** (He y col. 2011) ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 5.10 (d, 1H, J =1.6 Hz, $1\alpha\text{-H}$), 5.02 (d 1H, J =1.7 Hz, $1\beta\text{-H}$), 4.43 (dd, 1H, J =1.7, 4.4 Hz, $2\beta\text{-H}$), 4.30 (dd 1H, J =1.6, 4.7 Hz, $2\alpha\text{-H}$), 4.13 (s, 2H, $8\alpha\text{-H}$), 4.09 (s, 2H, $8\beta\text{-H}$), 4.03 (dd, 1H, J =4.7, 9.9 Hz, $3\alpha\text{-H}$), 3.85 (dd, 1H, J =2.3, 12.2 Hz, $6\beta\text{-Ha}$), 3.81-3.77 (m, 4H, $5\alpha\text{-H}$, $6\alpha\text{-H}$, $3\beta\text{-H}$, 3.73 (dd, 1H, J =5.4, 12.5 Hz, $6\beta\text{-Hb}$), 3.56 (t, 1H, J = 9.9 Hz, $4\alpha\text{-H}$), 3.46 (t, 1H, J = 9.8 Hz, $4\beta\text{-H}$), 3.38 (ddd, 1H, J = 2.2, 5.2 9.9 Hz, $5\beta\text{-H}$); ^{13}C NMR (125 MHz): δ =176.0 (C-7 β), 175.1 (C-7 α), 92.9 (C-1 α,β), 76.5 (C-5 β), 72.1, 72.0 (C-3 β , 5 α), 68.8 (C-3 α), 66.8, 66.6 (C-4 α,β), 61.0, 60.9 (C-8 α,β), 60.5, 60.4 (C-6 β,α), 53.8 (C-2 β), 52.9 (C-2 α).

En el siguiente paso para la síntesis del Neu5Gc, se llevó a cabo la reacción con aldolasa comercial (Neu5Ac aldolasa. Sorachim) tal y como se describe en el

apartado V.2.4.3.2.1.2, utilizando como sustratos la *N*-glicolil-D-Manosamina y piruvato en tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,6 a 37 °C y 18h (**Esquema 22**).



Esquema 22. Síntesis enzimática de Neu5Gc mediante la reacción con NeuA aldolasa, utilizando como sustrato *N*-glicolil-D-Manosamina y piruvato. Se marca en rojo el enlace creado por la enzima.

El seguimiento de la reacción se realizó por TLC, utilizando como fase móvil butanol:acetona:etanol:agua en relación 35:35:7:23 (**Figura 72**). Se finalizó la reacción con etanol y baño de hielo. El crudo fue centrifugado y el sobrenadante concentrado en rotavapor y purificado en una columna Bio Gel P-2 de Biorad, utilizando agua destilada como fase móvil según lo descrito en el apartado V.2.5.6. Las fracciones que contenían el compuesto fueron concentradas en rotavapor. El proceso de purificación se repitió una segunda vez en las mismas condiciones. El

compuesto final fue caracterizado por RMN (apartado V.2.7.2). Se obtuvo un rendimiento del 80%.

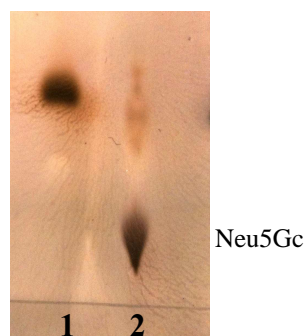


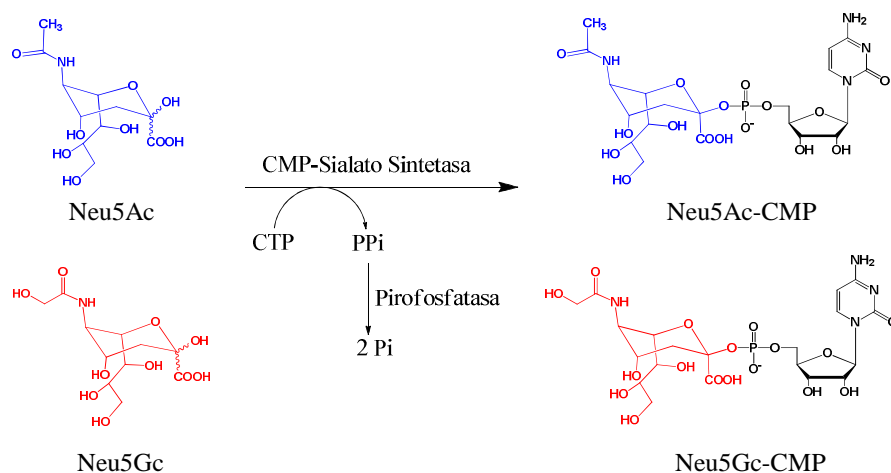
Figura 72. TLC de la reacción de síntesis de Neu5Gc utilizando como fase móvil butanol:acetona:etanol:agua en relación 35:35:7:23. En 1) T₀ de la reacción donde se observa N-glicolil-D-Manosamina. En 2) se observa el Neu5Gc

Ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5GC): (He y col. 2011) ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ= 3.92-3.82 (m, 4H, 4-H, 6-H, 11-H), 3.73 (t, 1H *J*=10.1Hz, 5-H), 3.55 (dd, 1H, *J*=2.9, 11.9 Hz, 9-Ha), 3.50-3.43 (m, 1H, 8-H), 3.34 (t, 1H, *J*=6.2, 11.8 Hz, 9-Hb), 3.26 (dd, 1H, *J*=1.2, 9.2 Hz, 7-H), 2.05 (dd, 1H, *J*=13.1, 4.9 Hz, 3-Ha), 1.62 (dd, 1H, *J*=13.1, 6.9 Hz, 3-Hb); ¹³C NMR (125 MHz): δ=176.0 (C-1), 173.7 (C-10), 95.7 (C-2), 70.6 (C-4, C-8), 68.5 (C-7), 66.8 (C-6), 63.5 (C-9), 61.4 (C-11), 52.1 (C-5), 39.3 (C-3).

III.4.1.2. Activación de ácidos siálicos con CMP

Una vez obtenidos los ácidos siálicos, el Neu5Ac y el Neu5Gc, se procedió a su activación con citidina monofosfato (CMP) para que pudieran ser utilizados como sustrato por las enzimas sialiltransferasas. Para ello se realizó la reacción de activación con la enzima CMP-sialato sintetasa de *Neisseria meningitidis*, según el protocolo del apartado V.2.4.3.2.2, con citidina trifosfato (CTP) en tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,6, a 37 °C y 24h (Esquema 23). La enzima utiliza Mg²⁺ como cofactor, por lo que el tampón está enriquecido con MgCl₂ en una concentración 50 mM. A pH inferior a 8 el siálico activado no es estable y puede hidrolizarse el CMP, por lo

que la reacción se llevó a cabo en un aparato tritador (Metrohm 665 Dosimat) programado para mantener el pH a 8,6 con NaOH 2M. En la reacción, para unir el CMP al siálico se produce la hidrólisis del CTP y se libera pirofosfato (PPi). Éste inhibe la actividad enzimática, por lo que se añadió otra enzima, la pirofosfatasa inorgánica, para hidrolizar el pirofosfato a fosfato (**Esquema 23**).



Esquema 23. Reacción de activación de ácidos siálicos con CMP mediante el uso de la enzima CMP-sialato sintetasa.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC, utilizando como fase móvil N-propanol/H₂O/NH₃ en relación 8:2:1 (**Figura 73**). El medio de reacción se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 3 min y el sobrenadante fue liofilizado (apartado V.2.5.7) y conservado a -20 °C para su posterior utilización.

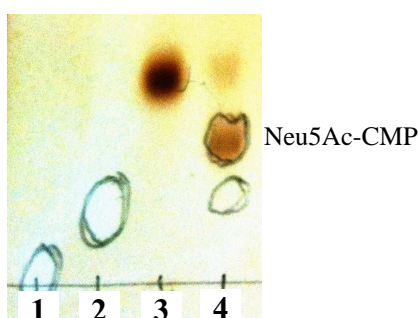
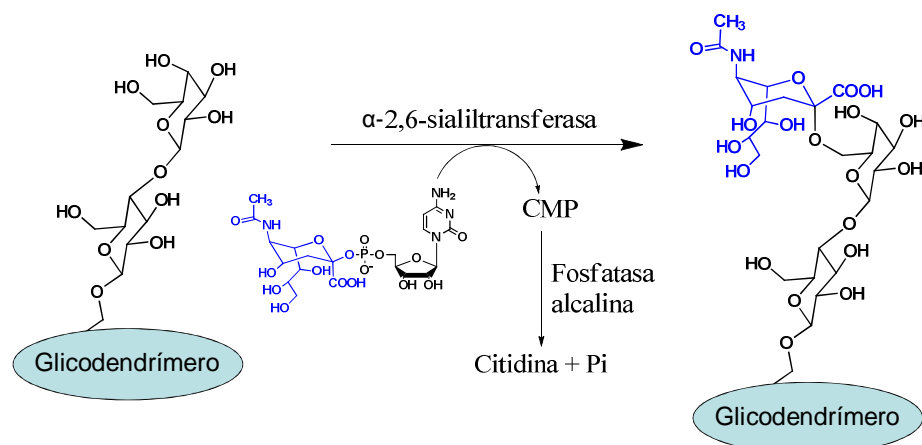


Figura 73. TLC de la reacción de activación de ácidos siálicos con CMP mediante el uso de la enzima CMP-sialato sintetasa. En 1) CTP, en 2) CMP, en 3) Neu5Ac y en 4) crudo de reacción con Neu5Ac-CMP

III.4.2. Funcionalización de glicodendrimeros con derivados de ácido siálico mediante el uso de enzimas sialiltransferasa

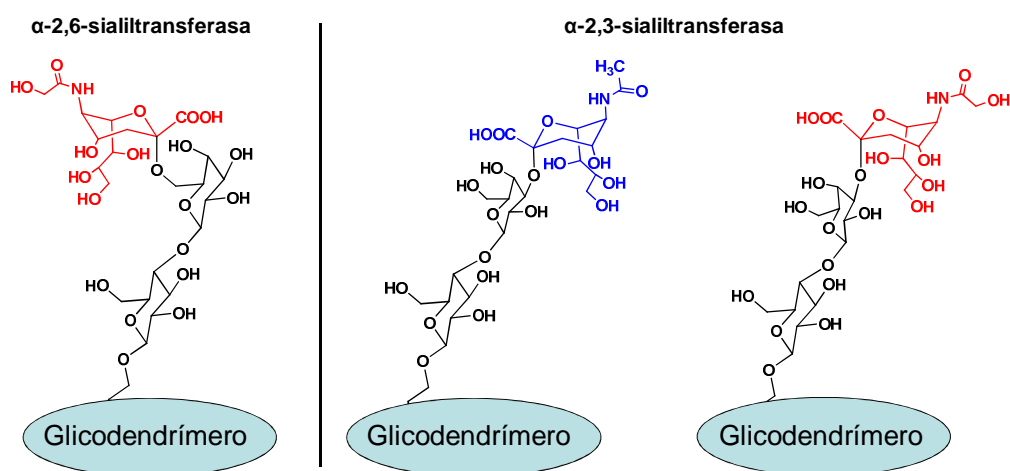
Los sialoconjugados, Neu5Ac-CMP y Neu5Gc-CMP, fueron utilizados para la funcionalización de glicodendrimeros mediante sialiltransferasas. Éstos llevan incorporada una molécula de lactosa en el extremo de cada uno de sus brazos, con la galactosa como azúcar terminal, aceptor natural de las sialiltransferasas. Para las reacciones de sialización se utilizaron dos tipos de enzimas sialiltransferasa: la α -2,6-sialiltransferasa (α 2,6SiaT) de *Photobacterium leiognathi*, que enlaza el carbono 2 del siálico al carbono 6 de una molécula de galactosa (Yamamoto y col. 2007), y la α -2,3-sialiltransferasa (α 2,3SiaT) de *Photobacterium phosphoreum*, que une el carbono 2 del siálico con el carbono 3 de una molécula de galactosa (Tsukamoto y col. 2007).

Las reacciones con α 2,6SiaT se llevaron a cabo según las condiciones descritas en el apartado V.2.4.3.2.3, en tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,6, a 30 °C, enriquecido con MgCl₂ 50 mM como cofactor. Se añadieron 2 equivalentes de siálico activado con CMP como donador por cada brazo de glicodendrimer. Puesto que el siálico-CMP no es estable a pH inferior a 8, éste se controló en todo momento con NaOH 0,5 M. En la reacción se libera el CMP, que inhibe la actividad enzimática, por ello se añadió una segunda enzima, la fosfatasa alcalina, que lo hidroliza a citidina y fosfato. Cuando dejaba de disminuir el pH de la reacción, evidencia de que ésta había terminado, se tomaba una alícuota para seguir la reacción por HPLC (apartado V.2.7.1.2) y se añadía otro equivalente de donador por cada brazo del dendrimer, hasta los cinco equivalentes. Finalizadas las reacciones, el crudo fue centrifugado a 13.000 r.p.m. y concentrado en rotavapor. En el **Esquema 24** se muestra la reacción de α 2,6SiaT con Neu5Ac-CMP como donador y una de las lactosas de un glicodendrimer como aceptor.



Esquema 24. Reacción de funcionalización de un glicodendrímtero con la enzima α 2,6SiaT utilizando Neu5Ac-CMP como donador

Se siguió la misma metodología (apartado V.2.4.3.2.3) para las reacciones con NeuGc-CMP como donador y con la enzima α 2,3SiaT con NeuAc-CMP y NeuGc-CMP como donadores, esperándose los productos del **Esquema 25**.



Esquema 25. Productos de la reacción de sialización de glicodendrímtero con las enzimas α 2,6SiaT y α 2,3SiaT utilizando Neu5Ac-CMP y Neu5Gc como donadores.

III.4.2.1. Reacciones con la enzima $\alpha 2,6$ SiaT de *P. leiognathi*

Las reacciones se realizaron tal y como se describe anteriormente, en el apartado III.4.2, En la **Figura 74** se muestran, como ejemplo, los cromatogramas del seguimiento por HPLC (apartado V.2.7.1.2) de la reacción de funcionalización del glicodendrúmero G1.4 (**Figura 74A**), utilizando Neu5Ac-CMP como donador. En la **Figura 74B** aparece el cromatograma del patrón del glicodendrúmero G1.4 sin reaccionar, en la **Figura 74C** se muestra un cromatograma de un punto intermedio de la reacción, donde se pueden observar diferentes picos, resultado de la progresiva funcionalización de los diferentes brazos del D1.4. En la **Figura 74D** se muestra el cromatograma con la reacción terminada. Según avanza la reacción, el CMP es liberado e hidrolizado por la fosfatasa alcalina para dar citidina, pico que también aparece en los cromatogramas, a un tiempo menor que el glicodendrúmero.

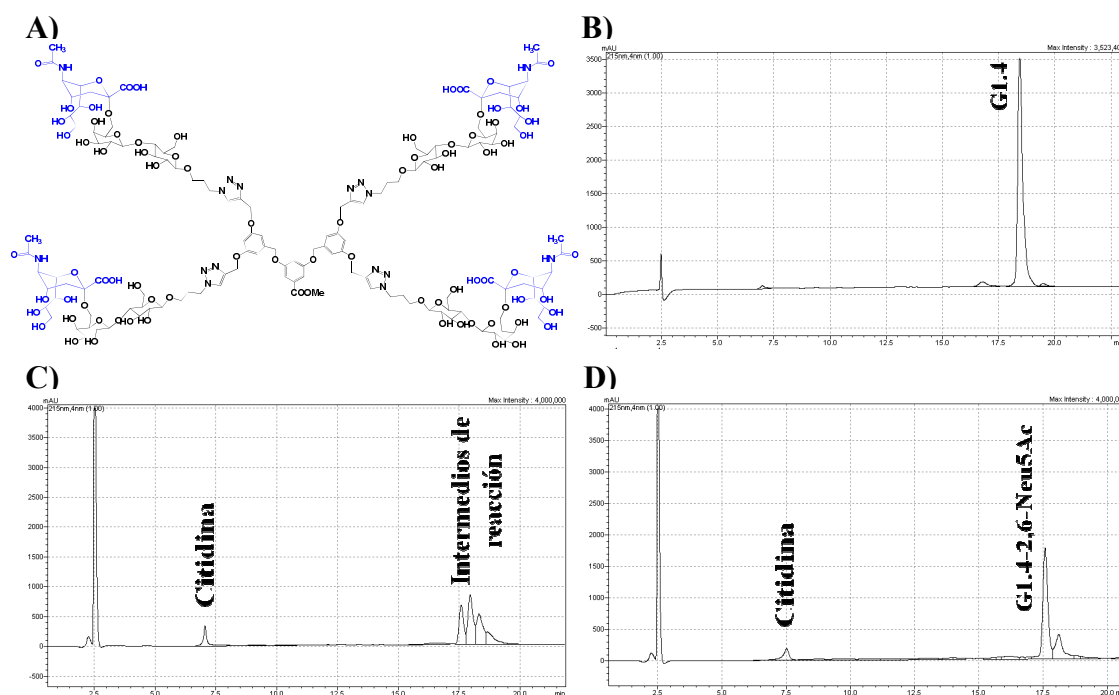


Figura 74. Cromatogramas que muestran la evolución de la reacción de la enzima $\alpha 2,6$ SiaT de *P.leiognathi*. A) G1.4-2,6-Neu5Ac. B) Patrón de glicodendrúmero. C) Reacción en estadio intermedio. D) Reacción finalizada.

III.4.2.2. Reacciones con la enzima $\alpha 2,3$ SIAT de *P. phosphoreum*

Las reacciones se realizaron tal y como se describe anteriormente en el apartado III.4.2, utilizando Neu5Ac-CMP y Neu5Gc-CMP como donadores y los glicodendrimeros como aceptores. La muestra un cromatograma de la reacción con la enzima $\alpha 2,3$ SiaT con el glicodendrimer G1.4 como aceptor después de haber añadido cinco equivalentes de Neu5Ac-CMP. Como se puede observar, la enzima no fue capaz de completar la reacción, obteniéndose una mezcla de productos compuesta por el glicodendrimer con distinto número de brazos funcionalizados con Neu5Ac. Este resultado se obtuvo con todos los glicodendrimeros, y utilizando tanto Neu5Ac-CMP como Neu5Gc-CMP como donadores, por lo que se concluyó que la enzima $\alpha 2,3$ SiaT no es apropiada para la unión de siálicos a este tipo de moléculas. A pesar de ello, se intentaron purificar los distintos productos para tratar de obtener algo de producto final puro, tal como se describe en el apartado siguiente (III.4.2.3)

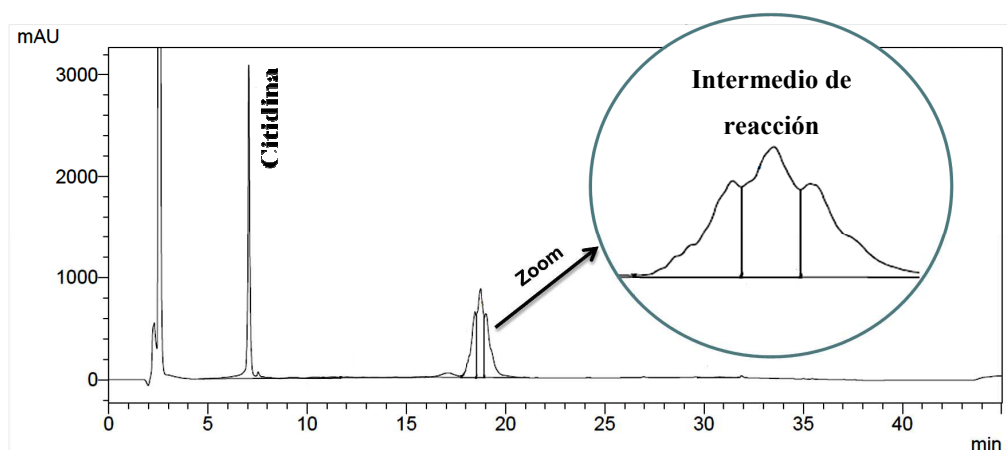


Figura 75. Cromatograma que muestra la evolución de la reacción con la enzima $\alpha 2,3$ SiaT de *P.phosphoreum* con el glicodendrimer DA4 como aceptor después de haber añadido cinco equivalentes de Neu5Ac-CMP. 1. Citidina. 2. Intermedio de reacción.

III.4.2.3. Purificación de sialilglicodendrimeros

Finalizadas las reacciones se procedió a la purificación de los 24 productos sializados (seis con 2,6-Neu5Ac, seis con 2,6-Neu5Gc, seis reacciones inacabadas con 2,3-Neu5Ac y seis con 2,3-Neu5Gc) en una columna de BioGel P-2 (BioRad), tal y como se describe en el apartado V.2.5.6. Esta columna, de 170 por 2 cm separaba los distintos componentes del crudo de reacción por tamaño molecular, utilizando como fase móvil agua destilada. Se analizaron por TLC las diferentes fracciones obtenidas de la separación, utilizando como fase móvil butanol:acetona:acético:agua en relación 32:33:7:28. En la **Figura 76A** se muestra, como ejemplo, la TLC de purificación del sialilglicodendrimer G1.2-2,6-Neu5Ac. Todos las purificaciones de las reacciones con las enzima α 2,6SiaT mostraban el mismo aspecto, en el que se obtiene un solo producto purificado. En la **Figura 76B** se muestra, como ejemplo, la purificación del compuesto DA3-2,3-Neu5Gc. Como se puede observar, la columna, incluso después de dos pasadas, no es capaz de separar los intermedios de reacción del producto final. Esto ocurrió con todas las purificaciones de las reacciones con la enzima α 2,3SiaT, por lo que después de la purificación, todos los compuestos obtenidos seguían siendo una mezcla. La localización de los tubos que contenían glicodendrimeros de tipo G2 se podía simplificar gracias a las cualidades fluorescentes de éstos, ya que brillaban bajo luz UV (**Figura 76C**).

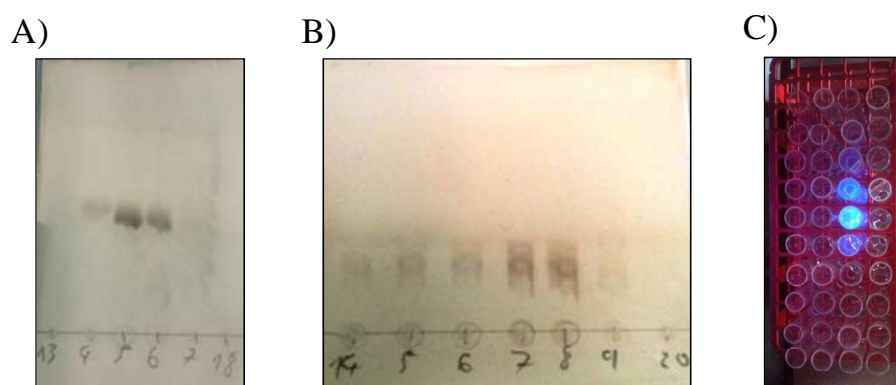


Figura 76. A) TLC de lapurificación del sialilglicodendrimer G1.2-2,6-Neu5Ac. B) TLC de purificación del compuesto G1.3-2,3-Neu5Gc. C) Localización de los tubos de compuestos de la serie G2 vistos bajo luz UV.

Se calcularon los rendimientos de los productos purificados, una vez liofilizados, respecto a los glicodendrimeros de partida en cada una de las reacciones, tal y como se muestra en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Rendimientos de las reacciones de funcionalización de glicodendrimeros utilizando Neu5Ac-CMP y Neu5Gc-CMP como donadores mediante las enzimas $\alpha 2,6\text{SiaT}$ y $\alpha 2,3\text{SiaT}$

$\alpha 2,6\text{SiaT}$	Rendimiento (%)	$\alpha 2,3\text{SiaT}$	Rendimiento (%)
G1.2-2,6-Neu5Ac	44	G1.2-2,3-Neu5Ac	44
G1.3-2,6-Neu5Ac	54	G1.3-2,3-Neu5Ac	54
G1.4-2,6-Neu5Ac	55	G1.4-2,3-Neu5Ac	48
G1.2-2,6-Neu5Gc	43	G1.2-2,3-Neu5Gc	43
G1.3-2,6-Neu5Gc	52	G1.3-2,3-Neu5Gc	52
G1.4-2,6-Neu5Gc	54	G1.4-2,3-Neu5Gc	52
G2.2-2,6-Neu5Ac	48	G2.2-2,3-Neu5Ac	37
G2.3-2,6-Neu5Ac	44	G2.3-2,3-Neu5Ac	49
G2.4-2,6-Neu5Ac	47	G2.4-2,3-Neu5Ac	43
G2.2-2,6-Neu5Gc	53	G2.2-2,3-Neu5Gc	42
G2.3-2,6-Neu5Gc	54	G2.3-2,3-Neu5Gc	52
G2.4-2,6-Neu5Gc	52	G2.4-2,3-Neu5Gc	53

III.4.2.4. Caracterización estructural de los 2,6-sialoglicodendrimeros

Los sialoglicodendrimeros purificados, obtenidos en la reacción con la enzima $\alpha 2,6\text{SiaT}$ y funcionalizados con Neu5Ac y Neu5Gc, fueron caracterizados por RMN (apartado V.2.7.2), como se describe a continuación:

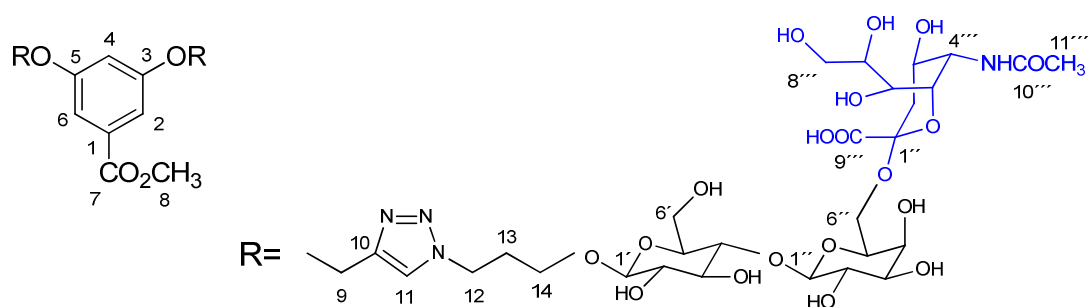
- G1.2-2,6-Neu5Ac

Figura 77. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímtero G1.2-2,6-Neu5Ac.

^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 1.70 (4H, t, $J=12$ Hz, H-2''B), 1.99 (6H, s, H-11''), 2.17 (4H, m, H-13), 2.68 (4H, dd, $J=12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.28 (2H, dd, $J=9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.45 (2H, H-5'), 3.45 (2H, H-2'), 3.45 (4H, H-14B), 3.53 (2H, H-5'''), 3.53 (2H, H-3'''), 3.57 (2H, H-3'), 3.57 (2H, H-4'), 3.58 (2H, H-7'''), 3.60 (4H, H-6'B), 3.68 (4H, H-8'''), 3.75 (2H, H-5''), 3.75 (4H, H-14A), 3.76 (4H, H-6'B), 3.80 (2H, H-4'''), 3.80 (2H, H-6'''), 3.80 (4H, H-6'A), 3.85 (3H, s, H-8), 3.88 (4H, H-6'A), 3.90 (2H, H-4'), 4.25 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.37 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.55 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-12), 5.25 (4H, s, H-9), 6.88 (1H, H-4), 7.25 (2H, s, H-2 y H-6), 8.08 (2H, s br, H-11).

^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ (ppm): 22.08 (C11''), 29.46 (C13), 40.14 (C2'''), 47.13 (C12), 51.82 (C4'''), 52.95 (C8), 59.37 (C8'''), 60.25 (C6'), 61.73 (C9), 62.68 (C6''), 66.24 (C14), 68.4 (C3'''), 68.56 (C4'), 68.56 (C7'''), 70.82 (C2'), 71.83 (C6'''), 72.36 (C5'''), 72.44 (C3'), 72.72 (C2'), 73.73 (C5'), 74.61 (C3'), 74.61 (C5'), 79.64 (C4'), 100.32 (C1'''), 102.03 (C1'), 103.27 (C1'), 108.00 (C4), 109.67 (C2 y C6), 125.62 (C11), 131.8 (C1), 142.90 (C10), 158.61 (C3 y C5), 168.00 (C7), 173.51 (C9'''), 174.94 (C10''').

- G1.2-2,6-Neu5Gc

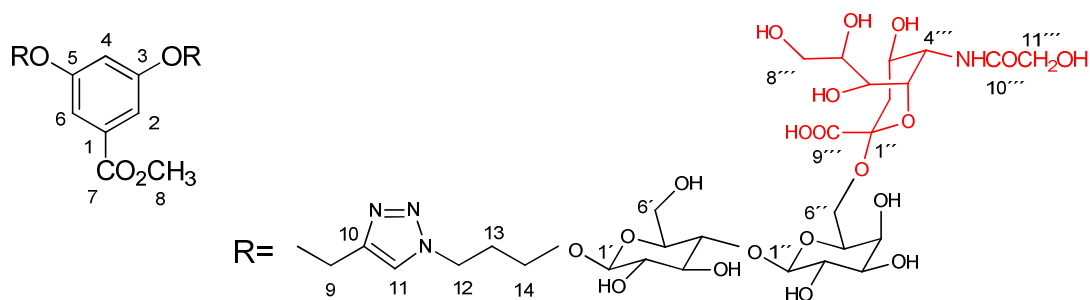
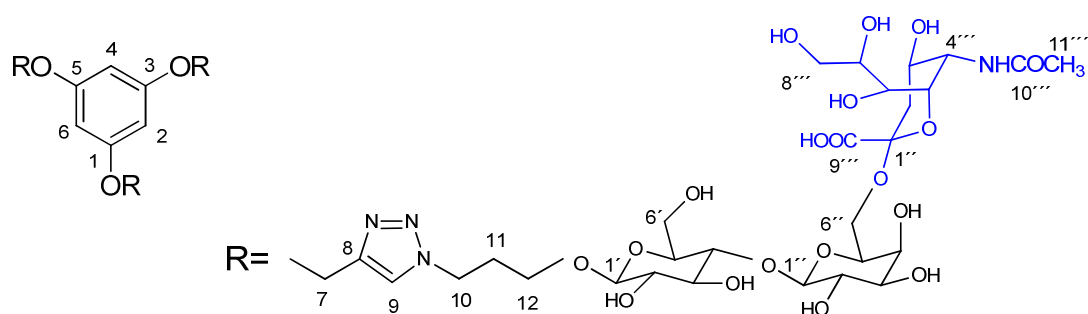


Figura 78. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímtero G1.2-2,6-Neu5Gc.

^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 1.73 (4H, t, $J = 12$ Hz, H-2''B), 2.19 (4H, m, H-13), 2.71 (4H, dd, $J = 12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.30 (2H, dd, $J = 9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.50 (4H, H-14B), 3.74 (2H, H-3'''), 3.58 (2H, H-3'), 3.58 (2H, H-4'), 3.58 (2H, H-7'''), 3.60 (2H, H-2''), 3.60-3.80 (2H, H-5'''), 3.65 (4H, H-6''), 3.71 (4H, H-8'''), 3.80 (2H, H-5'), 3.80 (2H, H-6'''), 3.78 (4H, H-6'B), 3.82 (4H, H-14A), 3.87 (4H, H-6''A), 3.90 (3H, s, H-8), 3.90 (4H, H-6'A), 3.92 (2H, H-4''), 3.93 (2H, H-4'''), 4.09 (4H, s, H-11'''), 4.27 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.39 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.54 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, H-12), 5.26 (4H, s, H-9), 6.88 (1H, H-4), 7.26 (2H, s, H-2 y H-6), 8.09 (2H, s br, H-11).

^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ (ppm): 29.49 (C13), 40.23 (C2'''), 47.16 (C12), 51.58 (C4'''), 52.99 (C8), 59.41 (C8'''), 60.29 (C6'), 61.49 (C11'''), 61.76 (C9), 62.68 (C6''), 66.27 (C14), 68.15 (C3'''), 68.41 (C7'''), 68.60 (C4'), 70.85 (C2''), 71.90 (C6'''), 72.32 (C5'''), 72.47 (C3'), 72.76 (C2'), 73.79 (C5'), 74.64 (C3'), 74.64 (C5'), 79.66 (C4'), 100.37 (C1'''), 102.06 (C1'), 103.30 (C1''), 108.51 (C4), 109.70 (C2 y C6), 125.64 (C11), 131.85 (C1), 142.96 (C10), 158.65 (C3 y C5), 168.10 (C7), 173.52 (C9'''), 175.72 (C10''').

G1.3-2,6-Neu5Ac**Figura 79** Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G1.3-2,6-Neu5Ac.

^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 1.69 (6H, t, $J=12$ Hz, H-2''B), 1.97 (9H, s, H-11''), 2.15 (6H, m, H-11), 2.66 (6H, dd, $J=12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.28 (3H, dd, $J=9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.45 (3H, H-5'), 3.46 (6H, H-12B), 3.51 (3H, H-2''), 3.60-3.80 (3H, H-5''), 3.55 (3H, H-3'), 3.55 (3H, H-4'), 3.60 (3H, H-7''), 3.60 (6H, H-6'B), 3.70 (6H, H-8''), 3.75 (3H, H-3''), 3.75 (3H, H-5'), 3.75 (6H, H-6'B), 3.79 (6H, H-12A), 3.80 (3H, H-4''), 3.80 (3H, H-6''), 3.80 (6H, H-6'A), 3.86 (6H, H-6'A), 3.90 (3H, H-4'), 4.27 (3H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.36 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.51 (6H, t, $J=6.5$ Hz, H-10), 5.15 (6H, s, H-7), 6.31 (3H, s, H-2, H-4 y H-6), 8.04 (3H, s br, H-9).

^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ (ppm): 22.09 (C11''), 29.49 (C11), 40.10 (C2''), 47.16 (C10), 51.83 (C4''), 59.36 (C8''), 60.25 (C6'), 61.51 (C7), 62.67 (C6''), 66.12 (C12), 68.26 (C3''), 68.40 (C7''), 68.55 (C4'), 70.81 (C2''), 71.79 (C6''), 72.42 (C5''), 72.57 (C3'), 72.73 (C2'), 73.71 (C5'), 74.59 (C3'), 74.59 (C5'), 79.62 (C4'), 96.63 (C2, C4 y C6), 100.28 (C1''), 102.02 (C1'), 103.27 (C1'), 125.54 (C9), 143.06 (C8), 159.40 (C1, C3 y C5), 173.41 (C9''), 175.08 (C10'').

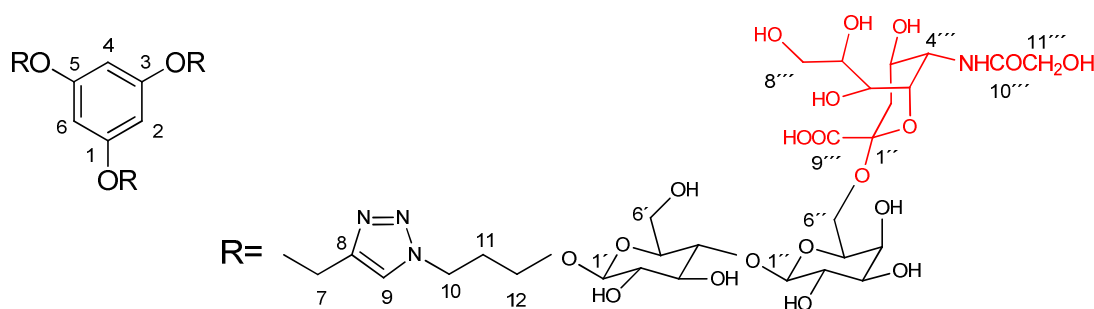
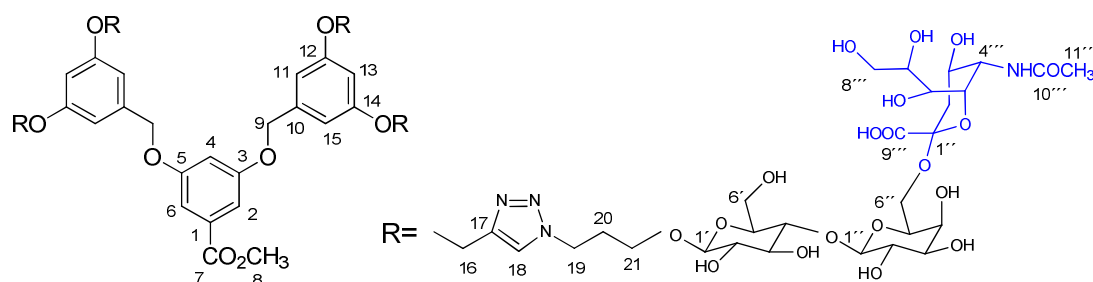
G1.3-2,6-Neu5Gc

Figura 80. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G1.3-2,6-Neu5Gc.

^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 1.71 (6H, t, $J = 12$ Hz, $\text{H-2}'''\text{B}$), 2.17 (6H, m, H-11), 2.70 (6H, dd, $J = 12$ y 5 Hz, $\text{H-2}'''\text{A}$), 3.28 (3H, dd, $J = 9.5$ y 7.9 Hz, $\text{H-2}'$), 3.43 (6H, H-12B), 3.50 (3H, $\text{H-5}'$), 3.50 (3H, $\text{H-7}''$), 3.57 (3H, $\text{H-3}'$), 3.57 (3H, $\text{H-4}'$), 3.60 (3H, $\text{H-2}''$), 3.60-3.80 (3H, $\text{H-5}'''$), 3.63 (6H, $\text{H-6}''\text{B}$), 3.72 (6H, $\text{H-8}'''$), 3.72 (3H, $\text{H-3}'''$), 3.73 (6H, $\text{H-6}''\text{B}$), 3.75 (6H, H-12A), 3.78 (3H, $\text{H-5}''$), 3.82 (6H, $\text{H-6}''\text{A}$), 3.83 (3H, $\text{H-6}'''$), 3.87 (6H, $\text{H-6}''\text{A}$), 3.88 (3H, $\text{H-4}''$), 3.90 (3H, $\text{H-4}'''$), 4.07 (6H, s, $\text{H-11}'''$), 4.28 (3H, d, $J = 7.9$ Hz, $\text{H-1}'$), 4.37 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, $\text{H-1}''$), 4.51 (6H, t, $J = 6.5$ Hz, H-10), 5.15 (6H, s, H-7), 6.30 (3H, s, H-2 , H-4 y H-6), 8.02 (3H, s br, H-9).

^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ (ppm): 29.50 (C11), 40.17 ($\text{C2}''$), 47.16 (C10), 51.54 ($\text{C4}''$), 59.90 ($\text{C8}'''$), 60.25 ($\text{C6}'$), 61.51 ($\text{C11}'''$), 61.73 (C7), 62.64 ($\text{C6}''$), 66.29 (C12), 68.11 ($\text{C3}'''$), 68.36 ($\text{C7}'''$), 68.56 ($\text{C4}'$), 70.81 ($\text{C2}''$), 71.91 ($\text{C6}'''$), 72.29 ($\text{C5}'''$), 72.42 ($\text{C3}''$), 72.74 ($\text{C2}'$), 73.74 ($\text{C5}''$), 74.61 ($\text{C3}'$), 74.61 ($\text{C5}'$), 79.64 ($\text{C4}'$), 96.60 (C2 , C4 y C6), 100.30 ($\text{C1}''$), 102.03 ($\text{C1}'$), 103.31 ($\text{C1}''$), 125.53 (C9), 143.06 (C8), 159.40 (C1 , C3 y C5), 173.46 ($\text{C9}'''$), 175.68 ($\text{C10}'''$).

G1.4-2,6-Neu5Ac**Figura 81.** Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímtero G1.4-2,6-Neu5Ac.

^1H RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 1.69 (8H, t, $J = 12$ Hz, H-2''B), 1.98 (12H, s, H-11''), 2.09 (8H, m, H-20), 2.68 (8H, dd, $J = 12$ y 5 Hz, H-2'''A), 3.28 (4H, dd, $J = 9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.45 (4H, H-5'), 3.45 (8H, H-21B), 3.50 (4H, H-2''), 3.52 (4H, H-3'''), 3.57 (4H, H-3'), 3.57 (4H, H-4'), 3.60 (4H, H-5'''), 3.60 (8H, H-6'B), 3.65 (4H, H-7'''), 3.70 (8H, H-8'''), 3.73 (8H, H-6'B), 3.69 (8H, H-21A), 3.80 (4H, H-5''), 3.80 (3H, s, H-8), 3.80 (4H, H-4'''), 3.80 (4H, H-6'''), 3.80 (8H, H-6'A), 3.87 (8H, H-6'A), 3.90 (4H, H-4'), 4.34 (4H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.37 (4H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.37 (8H, t, $J = 6.5$ Hz, H-19), 4.60 (4H, s br, H-9), 4.84 (8H, s br, H-16), 6.41 (4H, s, H-4), 6.41 (4H, s, H-11 y H-15), 6.41 (2H, H-13), 6.81 (3H, s, H-2 y H-6), 7.85 (3H, s br, H-18).

^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ (ppm): 22.04 (11''), 29.59 (C20), 40.11 (C2'''), 47.14 (C19), 51.85 (C4'''), 52.76 (C8), 59.36 (C8'''), 60.26 (C6'), 60.96 (C16), 62.67 (C6''), 66.30 (C21), 68.28 (C3'''), 68.41 (C7'''), 68.56 (C4'), 69 (C9), 70.81 (C2'), 71.79 (C6'''), 72.45 (C5'''), 72.57 (C3'), 72.74 (C2'), 73.68 (C5'), 74.62 (C3'), 74.62 (C5'), 79.61 (C4'), 100.31 (C1'''), 101.10 (C13), 102.03 (C1'), 103.31 (C1'), 106.74 (C4), 106.74 (C11 y C15), 108.41 (C2 y C6), 125.00 (C18), 131.41 (C1), 139.27 (C10), 143.12 (C17), 158.91 (C3 y C5), 158.91 (C12 y C14), 167.52 (C7), 173.44 (C9'''), 174.90 (C10''').

G2.2-2,6-Neu5Gc

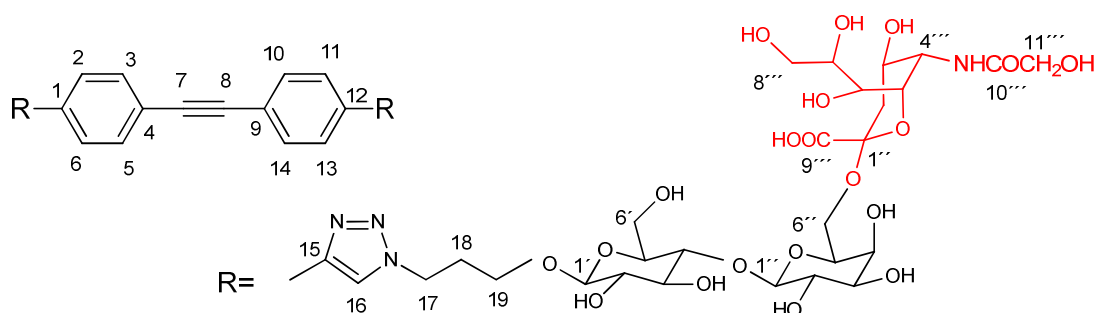


Figura 84. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G2.2-2,6-Neu5Gc.

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.35 (4H, t, $J=12$ Hz, H-2''B), 2.15 (4H, m, H-18), 2.66 (4H, dd, $J=12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.15 (2H, dd, $J=9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.20 (2H, H-2''), 3.21 (2H, H-7'''), 3.32 (2H, H-5'), 3.33 (2H, H-4'), 3.34 (4H, H-6''B), 3.38 (2H, H-3'), 3.43 (2H, H-4'''), 3.48 (2H, H-5'''), 3.50 (4H, H-8'''), 3.51 (4H, H-19B), 3.57 (2H, H-5'), 3.61 (4H, H-6''A), 3.62 (4H, H-6''B), 3.62 (2H, H-6'''), 3.64 (2H, H-4''), 3.68 (2H, H-3'''), 3.78 (4H, H-6'A), 3.82 (4H, H-19A), 4.07 (4H, s, H-11'''), 4.22 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.26 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.55 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-17), 7.66 (4H, d, $J=7.3$ Hz, H-3, H-5, H-10 y H-14), 7.92 (4H, d, $J=7.3$ Hz, H-2, H-6, H-11 y H-13), 8.69 (2H, s br, H-16).

^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 30.35 (C18), 42.43 (C2''), 47.13 (C17), 53.08 (C4''), 59.80 (C8'''), 60.99 (C6'), 61.72 (C11'''), 63.98 (C6''), 65.77 (C19), 67.63 (C3'''), 68.54 (C4'), 69.58 (C7'''), 71.00 (C2'), 71.88 (C6'''), 73.01 (C5'''), 73.37 (C3'), 73.59 (C2'), 74.20 (C5'), 75.34 (C3'), 75.34 (C5'), 81.06 (C4'), 90.48 (C7 y C8), 100.93 (C1''), 102.97 (C1'), 104.20 (C1'), 121.88 (C4 y C9), 122.90 (C16), 125.79 (C2, C6, C11 y C13), 131.55 (C1 y C12), 132.48 (C3, C5, C10 y C14), 145.96 (C15), 171.16 (C9'''), 175.12 (C10''').

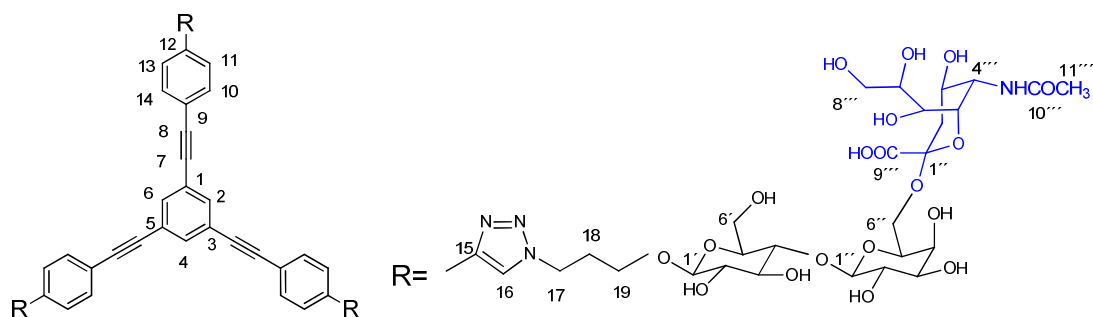
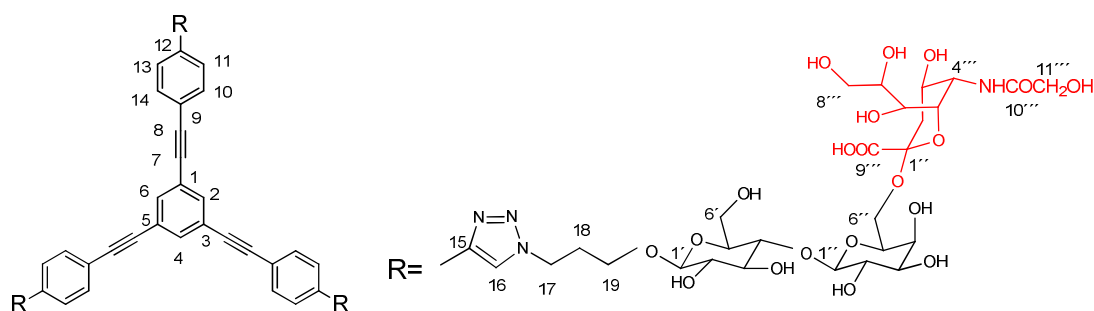
G2.3-2,6-Neu5Ac

Figura 85. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G2.3-2,6-Neu5Ac.

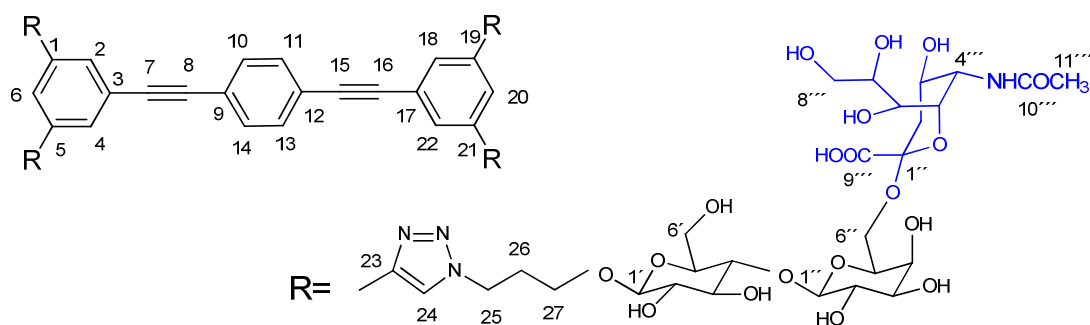
^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.32 (6H, t, $J=12$ Hz, H-2''B), 1.89 (9H, s, H-11'''), 2.15 (6H, m, H-18), 2.64 (6H, dd, $J=12$ y 5 Hz, H-2'''A), 3.11 (3H, dd, $J=9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.19 (3H, H-7'''), 3.31 (3H, H-4'), 3.30 (3H, H-2''), 3.32 (3H, H-5'), 3.33 (6H, H-6'B), 3.33 (6H, H-6''B), 3.35 (3H, H-5'''), 3.35 (3H, H-4'''), 3.37 (3H, H-3'), 3.48 (6H, H-8'''), 3.49 (6H, H-19B), 3.50 (3H, H-3'''), 3.56 (3H, H-5''), 3.58 (6H, H-6''A), 3.62 (3H, H-4''), 3.60 (3H, H-6'''), 3.76 (6H, H-6'A), 3.81 (6H, H-19A), 4.21 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.25 (3H, d, $J=7.9$ Hz, H-1''), 4.55 (6H, t, $J=6.6$ Hz, H-17), 7.70 (6H, d, $J=7.3$ Hz, H-10 y H-14), 7.82 (3H, s, H-2, H-4, H-6), 7.95 (6H, d, $J=7.3$ Hz, H-11 y H-13), 8.70 (2H, s br, H-16).

^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23.02 (C11'''), 30.35 (C18), 42.35 (C2'''), 47.07 (C17), 53.48 (C4'''), 59.92 (C8'''), 60.97 (C6'), 63.91 (C6''), 65.68 (C19), 67.91 (C3'''), 68.59 (C4'), 69.56 (C7'''), 71.00 (C2''), 71.80 (C6'''), 73.27 (C5'''), 73.39 (C3''), 73.59 (C2'), 74.25 (C5'), 75.33 (C3'), 75.33 (C5'), 81.09 (C4'), 88.60 (C7), 91.50 (C8), 100.93 (C1'''), 102.94 (C1'), 104.19 (C1''), 121.36 (C9), 122.85 (C16), 124.24 (C1, C3 y C5), 125.83 (C11 y C13), 132.01 (C12), 132.72 (C10 y C14), 134.20 (C2, C4 y C6), 145.87 (C15), 171.36 (C9'''), 172.70 (C10''').

G2.3-2,6-Neu5Gc**Figura 86.** Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G2.3-2,6-Neu5Gc.

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.32 (6H, t, $J=12$ Hz, H-2''B), 2.15 (6H, m, H-18), 2.66 (6H, dd, $J=12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.10 (3H, dd, $J=9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.18 (3H, H-7''), 3.30 (3H, H-2'), 3.31 (3H, H-4'), 3.31 (3H, H-5'), 3.32 (6H, H-6'B), 3.36 (3H, H-3'), 3.40 (3H, H-4''), 3.40 (6H, H-8''), 3.44 (3H, H-5''), 3.49 (6H, H-19B), 3.55 (3H, H-5'), 3.61 (6H, H-6'B), 3.65 (3H, H-3''), 3.58 (6H, H-6'A), 3.62 (3H, H-4'), 3.61 (3H, H-6''), 3.76 (6H, H-6'A), 3.81 (6H, H-19A), 3.88 (6H, s, H-11''), 4.20 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.25 (3H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.54 (6H, t, $J=6.6$ Hz, H-17), 7.70 (6H, d, $J=7.3$ Hz, H-10 y H-14), 7.82 (3H, s, H-2, H-4, H-6), 7.95 (6H, d, $J=7.3$ Hz, H-11 y H-13), 8.71 (2H, s br, H-16).

^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 30.32 (C18), 42.50 (C2''), 47.09 (C17), 53.11 (C4''), 58.83 (C8''), 61.00 (C6'), 61.74 (C11''), 64.01 (C6'), 65.56 (C19), 67.61 (C3''), 68.59 (C4'), 69.62 (C7''), 71.01 (C2'), 71.88 (6''), 73.39 (C5''), 73.51 (C3'), 73.71 (C2'), 74.20 (C5'), 75.34 (C3'), 75.34 (C5'), 81.15 (C4'), 88.57 (C7), 91.41 (C8), 100.98 (C1''), 102.95 (C1'), 104.21 (C1'), 121.29 (C9), 122.86 (C16), 124.23 (C1, C3 y C5), 125.83 (C11 y C13), 131.97 (C12), 132.72 (C10 y C14), 134.19 (C2, C4 y C6), 145.86 (C15), 171.19 (C9''), 175.10 (C10'').

G2.4-2,6-Neu5Ac**Figura 87.** Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G2.4-2,6-Neu5Ac.

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.33 (8H, t, $J = 12$ Hz, H-2''B), 1.89 (12H, s, H-11'''), 2.18 (8H, m, H-26), 2.64 (8H, dd, $J = 12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.10 (4H, dd, $J = 9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.20 (4H, H-7'''), 3.32 (4H, H-2''), 3.32 (4H, H-4'), 3.33 (4H, H-5'), 3.34 (4H, H-4'''), 3.34 (8H, H-6'B), 3.35 (4H, H-5'''), 3.38 (4H, H-3'), 3.47 (8H, H-8'''), 3.51 (4H, H-3'''), 3.53 (8H, H-27B), 3.55 (4H, H-5'), 3.58 (8H, H-6'A), 3.59 (4H, H-6'''), 3.62 (4H, H-4'), 3.63 (8H, H-6'B), 3.76 (8H, H-6'A), 3.82 (8H, H-27A), 4.21 (4H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.26 (4H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.56 (8H, t, $J = 6.6$ Hz, H-25), 7.72 (4H, s, H-10, H-11, H-13 y H-14), 8.02 (3H, s, H-2, H-4, H-18 y H-22), 8.46 (6H, d, $J = 7.3$ Hz, H-6 y H-20), 8.79 (2H, s br, H-24).

^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23.02 (C11'''), 30.32 (C26), 42.15 (C2'''), 47.39 (C25), 53.47 (C4'''), 59.80 (C8'''), 60.94 (C6'), 63.89 (C6''), 65.94 (C27), 67.74 (C3'''), 68.6 (C4'), 69.52 (C7'''), 71.01 (C2''), 71.80 (C6'''), 73.38 (5'''), 73.60 (C3''), 73.70 (C2'), 74.21 (C5'), 75.32 (C3'), 75.32 (C5'), 81.07 (C4'), 89.65 (C8 y C15), 91.16 (C7 y C16), 100.70 (C1'''), 102.98 (C1'), 104.34 (C1''), 122.30 (C6 y C2), 122.8 (C24), 122.91 (C3 y C17), 123.00 (C9 y C12), 127.59 (C2, C4, C18 y C22), 132.38 (C10, C11, C13 y C14), 132.59 (C1, C5, C19 y C21), 145.61 (C23), 171.65 (C9'''), 172.70 (C10''').

G2.4-2,6-Neu5Gc

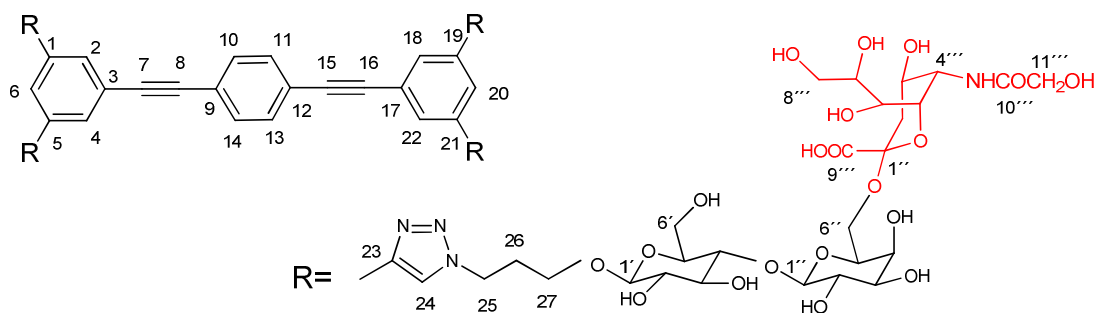


Figura 88. Asignación numérica de los carbonos del glicodendrímico G2.4-2,6-Neu5Gc.

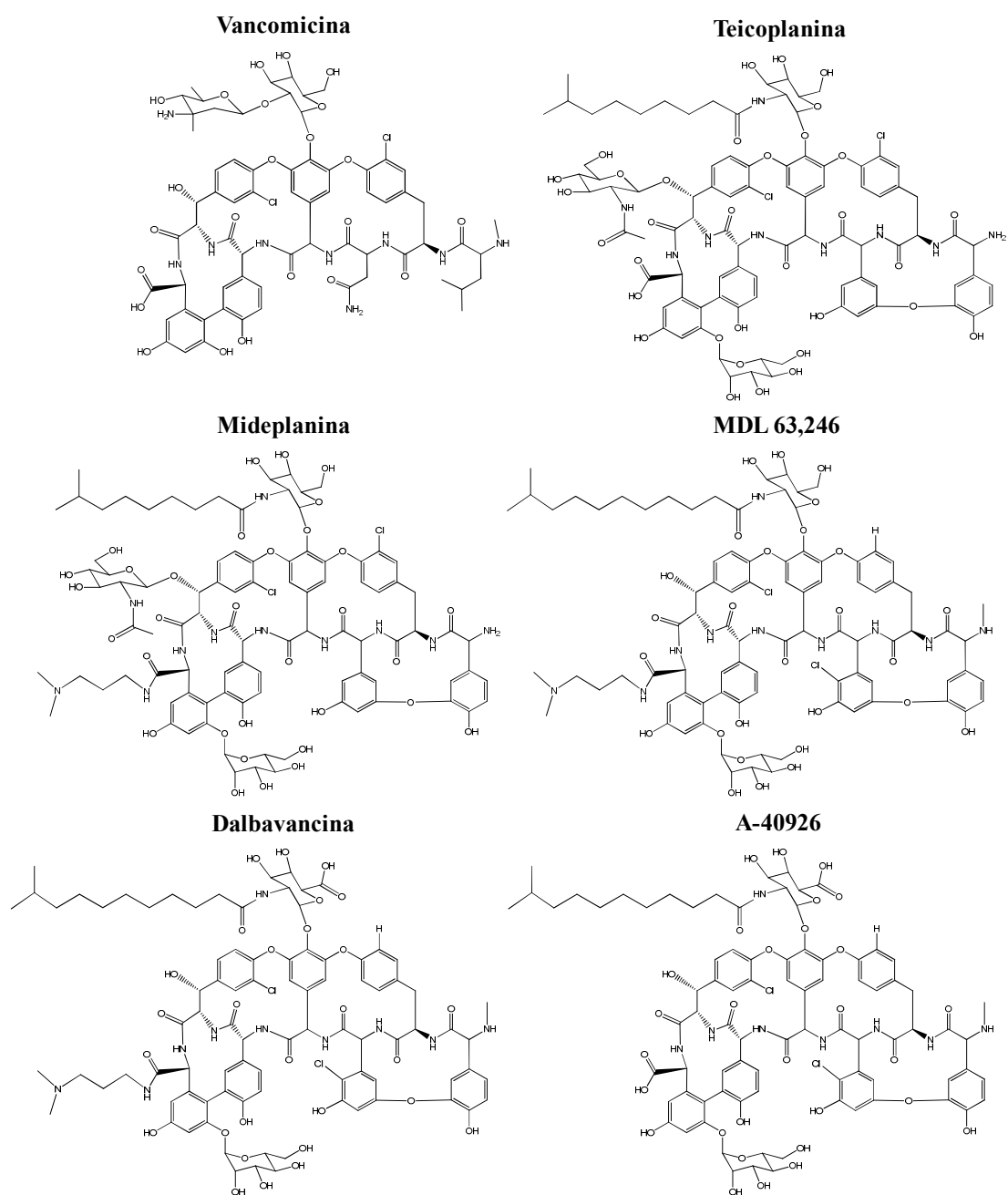
^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.33 (8H, t, $J = 12$ Hz, H-2''B), 2.18 (8H, m, H-26), 2.66 (8H, dd, $J = 12$ y 5 Hz, H-2''A), 3.09 (4H, dd, $J = 9.5$ y 7.9 Hz, H-2'), 3.19 (4H, H-7'''), 3.32 (4H, H-2'), 3.32 (4H, H-4'), 3.32 (8H, H-6'B), 3.33 (4H, H-5'), 3.35 (4H, H-5'''), 3.38 (4H, H-3'), 3.41 (4H, H-4'''), 3.45 (8H, H-8'''), 3.53 (8H, H-27B), 3.54 (4H, H-5'), 3.59 (8H, H-6'A), 3.60 (4H, H-6'''), 3.62 (8H, H-6'B), 3.63 (4H, H-4'), 3.67 (4H, H-3'''), 3.76 (8H, H-6'A), 3.83 (8H, H-27A), 3.87 (8H, s, H-11'''), 4.22 (4H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.27 (4H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.55 (8H, t, $J = 6.6$ Hz, H-25), 7.72 (4H, s, H-10, H-11, H-13 y H-14), 8.02 (3H, s, H-2, H-4, H-18 y H-22), 8.46 (6H, d, $J = 7.3$ Hz, H-6 y H-20), 8.79 (2H, s br, H-24).

^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 30.32 (C26), 42.23 (C2''), 47.28 (C25), 53.10 (C4'''), 60.00 (C8'''), 60.85 (C6'), 61.77 (C11'''), 63.96 (6'), 65.97 (C27), 67.60 (C3'''), 68.60 (C4'), 69.58 (C7'''), 71.01 (C2'), 71.85 (C6'''), 73.40 (C5'''), 73.62 (C3'), 73.71 (C2'), 74.25 (C5'), 75.32 (C3'), 75.32 (C5'), 81.05 (C4'), 89.60 (C8 y C15), 91.10 (C7 y C16), 100.90 (C1'''), 102.99 (C1'), 104.33 (C1'), 122.10 (C3 y C17), 122.23 (C2 y C6), 122.70 (C9 y C12), 122.83 (C24), 127.50 (C2, C4, C18 y C22), 132.38 (C10, C11, C13 y C14), 132.60 (C1, C5, C19 y C21), 145.67 (C23), 171.13 (C9'''), 175.10 (C10''').

Capítulo 5. Modificación estructural de glicopéptidos y estudio de interacciones con precursores de peptidoglicano

Como se explicó en la Introducción, entre las funciones de los azúcares se encuentra, además de su implicación en procesos de reconocimiento e interacción molecular, formar parte de diferentes tipos de glicoestructuras, como son los antibióticos de tipo glicopéptido (Esquema 26) (Courvalin 2006; Walsh y col. 2009; Xie y col. 2012). Éstos están formados por un esqueleto peptídico al que se unen átomos de cloro, diferentes residuos glicosídicos y, en algunos casos, cadenas lipídicas (formando los llamados lipoglicopéptidos). Son activos frente a bacterias gram positivas, y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, ya que se unen al extremo Lys-D-ala-D-ala de los precursores del peptidoglicano (Nieto y col. 1971). Sin embargo, estos antibióticos no son activos frente a enterococos resistentes a vancomicina (VRE), ya que han sustituido su precursor Lys-D-Ala-D-Ala por Lys-D-Ala-D-Lactato, lo que provoca que los glicopéptidos pierdan afinidad de unión al precursor (Walsh y col. 1996) (apartado I.1.3 de la Introducción). Solo dalbavancina y MDL 63,246 presentan una pequeña actividad frente a *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) (Goldstein y col. 1995; Colabella y col. 2008), y esto es debido a que las variaciones en los residuos unidos al heptapéptido diferencian la actividad de unos glicopéptidos a otros (**Esquema 26**). La modificación de estos residuos podría alterar la actividad de estos glicopeptidos.

Gracias a una colaboración con el grupo del Dr. Francesco Molinari, se decidió utilizar diferentes enzimas como lipasas, glucosa oxidasas, serín proteasas o glicosidasas para modificar la estructura de los lipoglicopéptidos, con el objetivo de obtener moléculas derivadas que pudieran ser activas frente a organismos resistentes. Además, se estudió la interacción de los antibióticos de tipo glicopéptido vancomicina, teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 (**Esquema 26**) con análogos de precursores de la pared bacteriana, AcLys-D-ala-D-ala y el AcLys-D-ala-D-lac, para profundizar en el conocimiento del proceso de unión de los glicopéptidos a los microorganismos, tanto sensibles como resistentes.



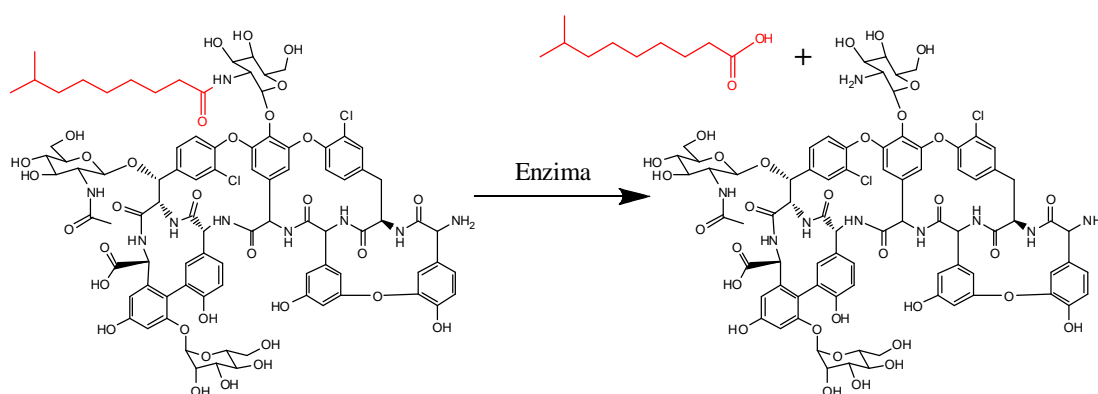
Esquema 26. Estructuras de los antibióticos de tipo glicopéptido utilizados en este trabajo

III.4.3. Modificación enzimática de la estructura de lipoglicopéptidos

Se utilizaron diferentes tipos de enzimas para la modificación estructural de los lipoglicopéptidos. Cada región del antibiótico tiene una función, por lo que la modificación de los residuos podría cambiar su actividad, llegando a redefinir su espectro de acción o solventar los problemas de afinidad con el precursor Lys-D-Ala-D-lactato presente en las cepas resistentes (Allen y *col.* 2002; Sosio y *col.* 2003; Zhanel y *col.* 2008). En el apartado I.1.3.1 de la introducción se explica detalladamente la función de cada región estructural de estos antibióticos.

III.4.3.1. Hidrólisis enzimática de la cadena hidrofóbica de lipoglicopéptidos

Se partió de la hipótesis de que cuanto mayor sea la polaridad de la cadena hidrofóbica de la región 1 (**Figura 8** del apartado I.1.3.1), mayor será la capacidad de anclaje del lipoglicopéptido a la membrana celular, por lo que podría aumentar el tiempo de unión al precursor del peptidoglicano. El objetivo de estos experimentos era localizar una enzima que pudiera hidrolizar la unión de esta cadena hidrofóbica (**Esquema 27**), para posteriormente unir otra más polar por transesterificación.

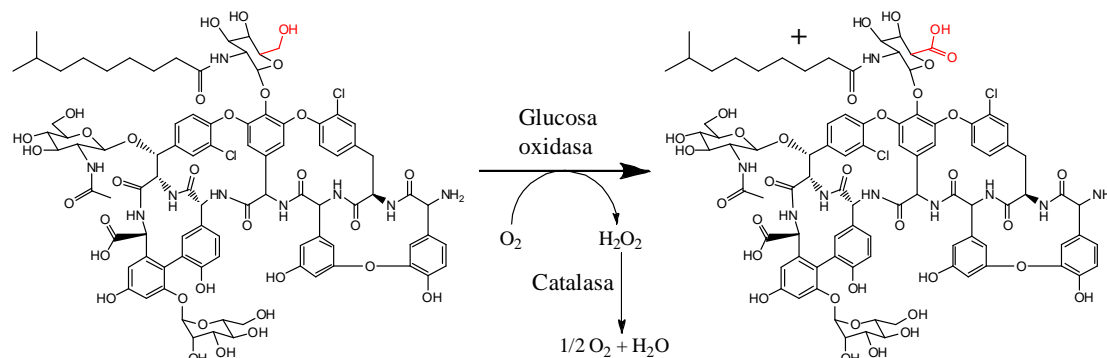


Esquema 27. Hidrólisis enzimática de la cadena hidrofóbica de teicoplanina.

Se llevaron a cabo las reacciones con teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 como sustratos, utilizando tres tipos de enzimas: lipasas de *Candida rugosa* y de *Pseudomonas stutzeri*, y subtilisina de *Bacillus subtilis*. Cada enzima tenía unas condiciones óptimas, por lo que las reacciones se realizaron según el protocolo descrito en el apartado V.2.4.3.3.1. Se tomó una alícuota cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Las muestras se analizaron por HPLC (apartado V.2.7.1.3.1). No se obtuvo actividad en ninguno de los ensayos con las tres enzimas.

III.4.3.2. Oxidación enzimática del residuo *N*-acil-glucosamina de lipoglicopéptidos

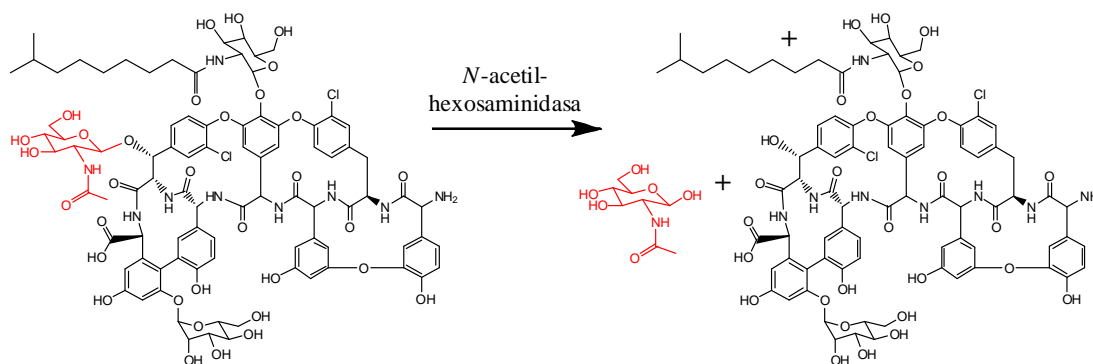
La oxidación del carbono 6 de la región 2 de los glicopéptidos (**Figura 8** del apartado I.1.3.1), aumenta su actividad antibiótica (Zhanel y col. 2008). Se utilizó la enzima glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* para la reacción de oxidación con teicoplanina, mideplanina y MDL 63,246, según las condiciones del apartado V.2.4.3.3.2 (Esquema 28). Se añadió catalasa de *Aspergillus niger* como enzima acoplada para descomponer el H_2O_2 formado en la oxidación. Se tomó una alícuota cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Las muestras se analizaron por HPLC (apartado V.2.7.1.3.2). No se obtuvo actividad en ninguno de los ensayos.



Esquema 28. Oxidación enzimática del residuo *N*-acil-glucosamina de teicoplanina mediante el uso de la enzima glucosa oxidasa.

III.4.3.3. Eliminación enzimática del residuo β -GlcNAc de lipoglicopéptidos

Como se explicó previamente, la eliminación del GlcNAc de la región 3 de los glicopéptidos (**Figura 8** del apartado I.1.3.1) disminuye su polaridad, lo que puede mejorar su capacidad de anclaje a la membrana (Kim, Kuti, y col. 2007). Se utilizaron tres tipos de enzimas *N*-acetil-hexosaminidasa: *Canavalia ensiformis*, *Aspergillus oryzae* y riñón bovino para la reacción con teicoplanina y mideplanina (Esquema 29), según las condiciones del apartado V.2.4.3.3. Se tomó una alícuota cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Las muestras se analizaron por HPLC (apartado V.2.7.1.3.1). No se obtuvo actividad en ninguno de los ensayos con las tres enzimas.

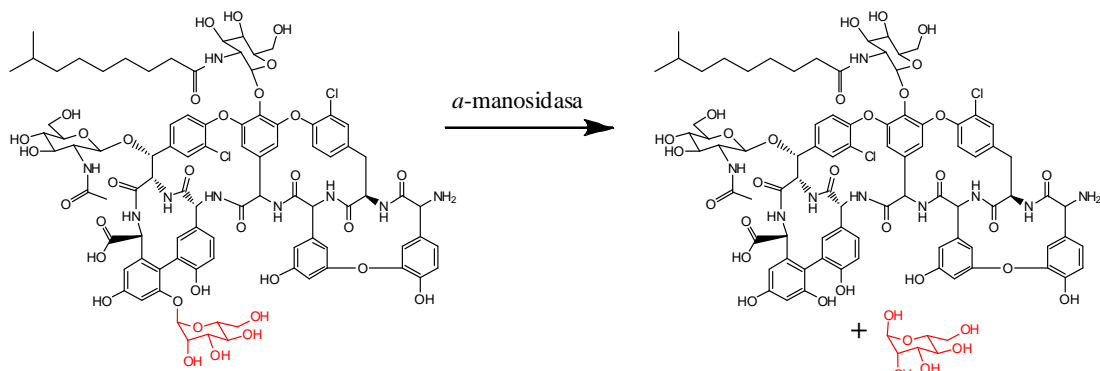


Esquema 29. Eliminación del residuo β -GlcNAc de teicoplanina mediante el uso de la enzima β -*N*-hexosaminidasa.

III.4.3.4. Eliminación enzimática de residuo α -manosa de lipoglicopéptidos

Como se explicó previamente, la eliminación del residuo de α -manosa de la región 6 de los glicopéptidos (**Figura 8** del apartado I.1.3.1) aumenta su vida media (Zhanel y col. 2010). Se utilizó la enzima α -manosidasa de *Canavalia ensiformis* para la reacción con teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246, según las condiciones del apartado V.2.4.3.3 (Esquema 30). Se tomó una alícuota

cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Las muestras se analizaron por HPLC (apartado V.2.7.1.3.1). No se obtuvo actividad en ninguno de los ensayos.



Esquema 30. Eliminación del residuo α -manosa de teicoplanina mediante el uso de la enzima α -manosidasa.

En ninguna de las reacciones se consiguió modificar la estructura de los lipoglicopéptidos. A pesar de que las técnicas enzimáticas generalmente llevan a cabo reacciones sobre residuos específicos de estructuras complejas, las enzimas utilizadas en este trabajo no han sido capaces de reconocer a los lipoglicopéptidos como sustratos. En trabajos anteriores del grupo del Dr. Molinari, se utilizaron células enteras para la modificación de estas moléculas (Gandolfi y *col.* 2007). Las cepas *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 (productor de A-40926) (Goldstein y *col.* 1987; Colabella y *col.* 2008), y *Actinomadura parvosata* ATCC 53463, (productor de parvodicina) (Christensen y *col.* 1987), fueron capaces de oxidar el carbono 6 del residuo *N*-acil-glucosamina de MDL 63,246 para obtener dalbavancina. Por otro lado, las cepas *Actinoplanes* sp. NRRL 3884 (productor de A-477) (Hamill RL 1973), *Actinoplanes missouriensis* ATCC 23342 (productor de actaplanina) (Debono y *col.* 1984) y *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 (productor de teicoplanina) (Parenti y *col.* 1978; Parenti y *col.* 2000), deacilaron la cadena hidrofóbica de dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 (Gandolfi y *col.* 2007). En ese trabajo también trataron de biotransformar los glicopéptidos con una batería de diferentes enzimas libres, sin éxito. Cabe destacar que todas las cepas que modificaron la estructura de los antibióticos eran cepas productoras de alguna

variedad de glicopéptido, lo que indica que es necesario poseer una maquinaria enzimática muy específica para manipular moléculas tan complejas como éstas.

III.4.4. Análisis de interacción glicopéptido-precursor de peptidoglicano mediante SPR

El estudio de las interacciones entre los glicopéptidos y los precursores de peptidoglicano y la superficie celular puede aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de estas moléculas, permitiendo un desarrollo racional de derivados más potentes farmacológicamente.

Se analizó por SPR la interacción de los antibióticos de tipo glicopéptido vancomicina, teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 (Esquema 26) con los análogos de precursores de peptidoglicano de la pared bacteriana AcLys-D-ala-D-ala y AcLys-D-ala-D-lactato. Para ello primero se preparó un chip CM5 de SPR uniendo AcLysDAlaDAlaOH en la celda 2 y ALysDAlaDLactato en la celda 3 según la metodología del apartado V.2.7.4.1. La celda 1 fue activada y bloqueada para ser utilizada como superficie de referencia. Se llevaron a cabo las mediciones de interacción en el SPR fluyendo los antibióticos sobre el chip, tal y como se describe en el apartado V.2.7.4.2.2.1. Los sensogramas obtenidos mostraron una excesiva densidad de ligando unido en la superficie del chip, lo que llevaba a errores de medida por saturación y limitación de transporte de masa (**Figura 89**).

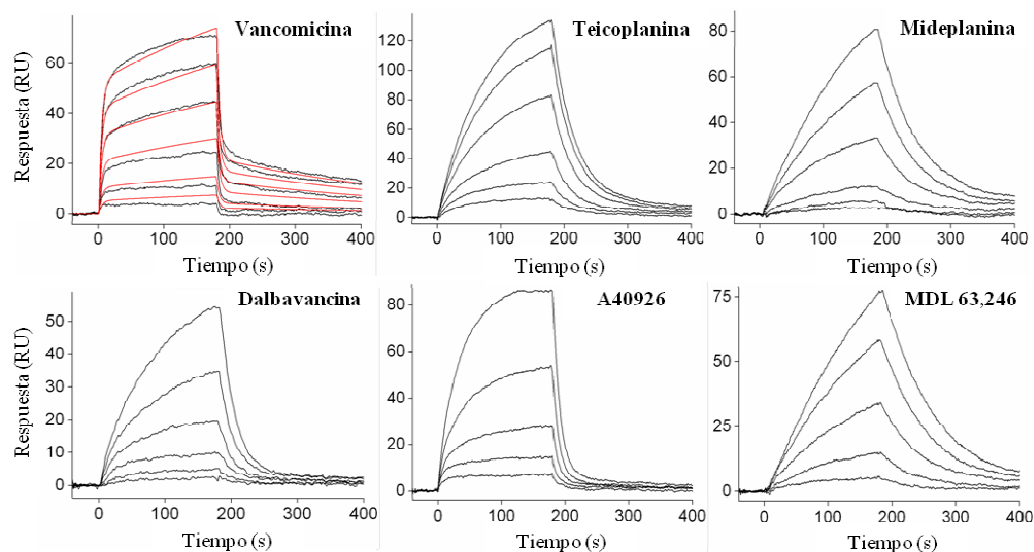


Figura 89. Sensogramas de SPR de la unión de los glicopéptidos con AcLysDAlaDAlaOH inmovilizado sobre un chip CM5, mostrando las fases de asociación y disociación.

Para evitar los problemas de saturación, se substituyó el chip CM5 por un CM4. Éste es similar al CM5, pero presenta menor grado de carboximetilación en el dextrano de su superficie, por lo que se une menos analito al chip y permite evitar los problemas encontrados con el CM5. Se llevaron a cabo las mediciones de interacción en el SPR fluyendo los antibióticos sobre el chip CM4, tal y como se describe en el apartado V.2.7.4.2.2.2. Los resultados de obtenidos se muestran en la **Figura 90**

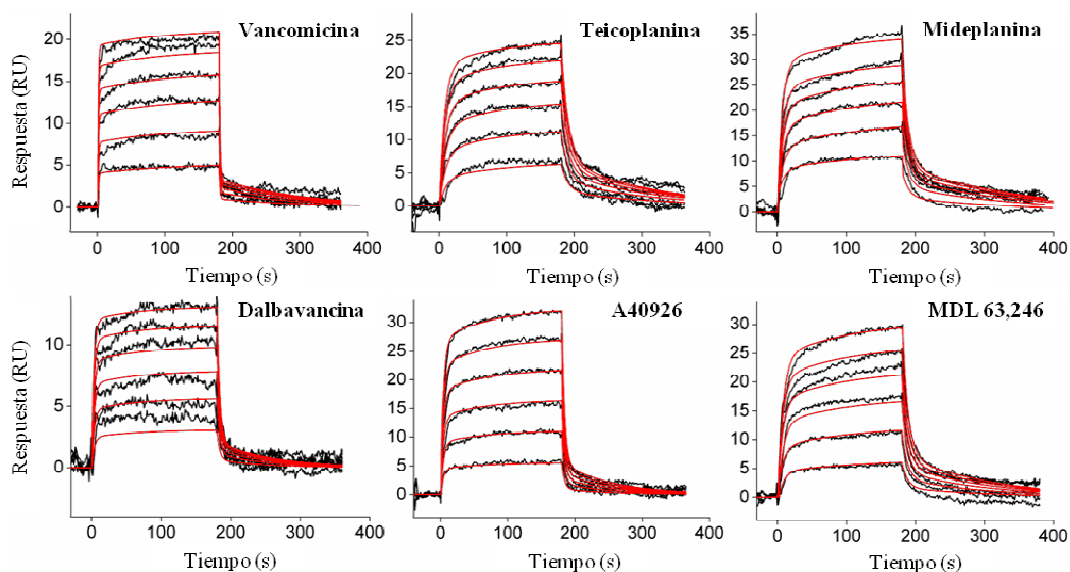


Figura 90. Sensogramas de SPR de la unión de los glicopéptidos con AcLysDAlaDAlaOH inmovilizado sobre un chip CM4 (líneas negras), mostrando las fases de asociación y disociación.

Los datos obtenidos en los sensogramas se ajustaban a un modelo de interacción bivalente (Biacore 1997), que se explicaría como la unión de una primera molécula de glicopéptido al AcLysDAlaDAlaOH y posteriormente la unión de una segunda. Esto se correspondería con el mecanismo de unión expuesto previamente por otros autores para vancomicina, según el cual, se produciría una dimerización de las moléculas de glicopéptido en la superficie celular, siendo este efecto aumentado en presencia de ligando (Williams y *col.* 1998). Este mecanismo podría explicar las señales de asociación obtenidas, que muestran un incremento inicial causado por la unión de una molécula de glicopéptido al AcLysDAlaDAlaOH de la superficie del chip, seguido de un aumento más gradual y menos marcado, que se asociaría con la unión de una segunda molécula de glicopéptido. Por otro lado, los perfiles de disociación muestran una fase inicial muy rápida y una segunda fase de disociación más lenta, que podrían ser debidas a que la unión de los glicopéptidos dimerizados y el AcLysDAlaDAlaOH de la superficie es más fuerte.

En la **Tabla 27** se muestran los parámetros cinéticos de la interacción, dos de cada tipo debido al modelo bivalente. Las K_{D1} y K_{D2} obtenidas, que se calcularon como k_{d1}/k_{a1} y k_{d2}/k_{a2} respectivamente, estaban en el rango nanomolar. Teicoplanina, mideplanina, dalbavancina y MDL 63,246 mostraron unas K_D menores, lo que denota uniones más fuertes al AcLysDAIaDAIaOH. Por el contrario, vancomicina y A-40926 muestran unas K_D más elevadas, lo que implica que la unión es más débil.

Tabla 27. Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción entre los glicopéptidos y AcLysDAIaDAIaOH unido al chip CM4.

Glicopéptido	$k_{a1} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{d1} (s^{-1})$	$k_{a2} (RU^{-1}s^{-1})$	$k_{d2} (s^{-1})$	$K_{D1} (nM)$	$K_{D2} (RU)$
Vancomicina	2.36×10^5	8.2×10^{-1}	3.8×10^{-5}	4.2×10^{-3}	3466	110
Teicoplanina	5.52×10^5	9.1×10^{-2}	6.0×10^{-5}	4.1×10^{-3}	165	68
Mideplanina	2.77×10^5	1.06×10^{-1}	3.5×10^{-5}	2.93×10^{-3}	383	83
Dalbavancina	8.9×10^5	2.9×10^{-1}	9.6×10^{-5}	7.1×10^{-3}	327	74
A-40926	2.42×10^4	2.53×10^{-1}	2.06×10^{-6}	6.1×10^{-3}	10455	2981
MDL63,246	1.70×10^5	1.21×10^{-1}	2.0×10^{-5}	4.1×10^{-3}	712	200

Hasta la fecha, se había atribuido la capacidad de dimerización solo a la vancomicina (Gerhard y *col.* 1993; Mackay, Gerhard, Beauregard, Westwell, y *col.* 1994; Schafer y *col.* 1996; Beauregard y *col.* 1997; Nitnai y *col.* 2009), ya que estudios con teicoplanina y lipoglicopéptidos similares evidenciaron que estos no dimerizan en soluciones acuosas (Mackay, Gerhard, Beauregard, Maplestone, y *col.* 1994). Los resultados obtenidos en las interacciones por SPR demuestran que no solo la vancomicina, sino también los lipoglicopéptidos, forman dímeros, pero la unión de la segunda molécula de lipoglicopéptido solo se produce cuando la primera ya está unida al AcLysDAIaDAIaOH en la superficie, produciéndose entonces la dimerización, lo que estabiliza la unión con el AcLysDAIaDAIaOH. Por lo tanto, existe dimerización, pero no en solución.

Ninguno de los glicopeptidos analizados produjo una señal de unión detectable frente al AcLysDAIaDLactato. Esto se corresponde con lo expuesto en la bibliografía, ya

que la sustitución de la amida de unión de la alanina por el ester del lactato en el precursor Lys-D-Ala-D-Lactato, elimina uno de los puentes de hidrógeno entre el glicopéptido y el precursor (**Figura 9** del apartado I.1.3.2), provocando que la interacción de la vancomicina en solución acuosa sea mil veces menor que con el precursor Lys-D-Ala-D-Ala, causando que este fármaco sea inútil frente a cepas resistentes por sustitución de un precursor por otro (VRSA y VRE) (Bugg y *col.* 1991; Walsh y *col.* 1996).

III.4.5. Modelado molecular del complejo formado entre glicopéptidos y precursores de peptidoglicano

Se utilizaron técnicas de modelado molecular para la obtención de la estructura tridimensional de los complejos formados entre los glicopéptidos y los precursores de peptidoglicano, como se describe en el apartado V.2.8.3. La combinación de protocolos de docking y los cálculos de mecánica y dinámica molecular ofrecieron diferentes soluciones a la estructura de los complejos. El complejo más estable formado entre teicoplanina y AcLysDAlaDAlaOH se muestra en la **Figura 91**, y se corresponde con aquellos modelos propuestos previamente para la unión de diferentes antibióticos frente a precursores de peptidoglicano (Barna y *col.* 1984). En la **Figura 91A** se muestra la estructura de mínima energía obtenida después de las simulaciones de dinámica molecular. En ella se muestra que los puentes de hidrógeno más importantes en la formación del complejo, son los tres unidos con el grupo carboxilo y el de la amida de la D-alanina terminal. Estas uniones se mantenían más del 90% del tiempo del proceso de dinámica molecular. Un puente de hidrógeno adicional (no mostrado en la figura), unido al CO de la lisina, se mantenía más del 50% del tiempo de la dinámica molecular. En la **Figura 91B** se observa la superposición de diez estructuras diferentes obtenidas durante la simulación, y muestra que el complejo está bien definido durante todo el proceso, contrastando con la libertad de movimiento de la cadena lateral de la lisina y la cadena hidrofóbica del glicopeptido, ya que no participan en la unión con el precursor.

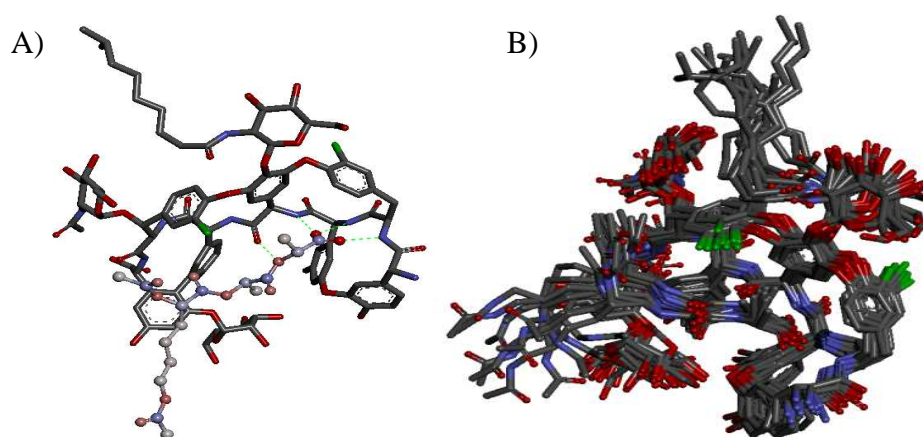


Figura 91. Modelado molecular del complejo formado entre teicoplanina y el precursor de peptidoglicano AcLysDAlaDAlaOH. A) Estructura de mínima energía. B) Superposición de diez estructuras obtenidas durante el proceso de dinámica molecular.

Se llevó a cabo una superposición de los complejos de teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 con AcLysDAlaDAlaOH, obtenidos por dinámica molecular y posterior minimización de energía (**Figura 92**). Los puentes de hidrógeno más importantes (descritos más arriba) estaban presentes en todos los casos durante más del 90% del tiempo de la simulación de dinámica molecular. La forma de los complejos formados es muy similar en todos ellos, así como el reconocimiento del extremo D-Ala-D-ala del precursor. También se pudieron observar diferencias en la orientación de las cadenas hidrofóbicas y en la cadena lateral de la lisina, debido a su libertad de movimiento.

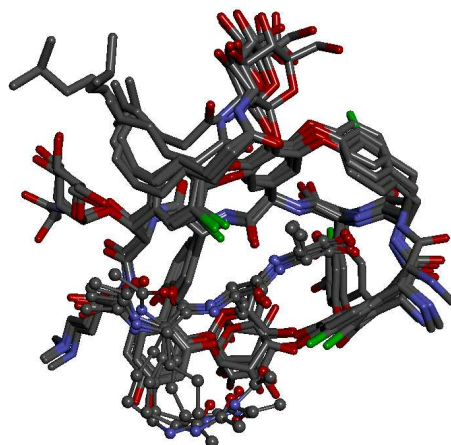


Figura 92. Superposición de los complejos de teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 con AcLysDAlaDAlaOH

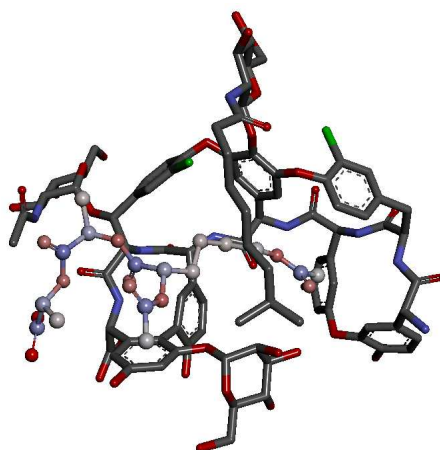


Figura 93. Estructura de mínima energía del complejo formado entre teicoplanina y el precursor de peptidoglicano AcLysDAlaDLactato.

En la dinámica molecular con el precursor AcLysDAlaDLactato no se observó la formación de un complejo estable en su interacción con los glicopéptidos (**Figura 93**). Durante el proceso, el precursor se separaba del sitio de unión, lo que indica que los tres puentes de hidrógeno formados con el grupo carboxilo terminal no eran capaces de mantener la molécula unida a la teicoplanina, a falta del puente de hidrógeno con el grupo NH, desaparecido al sustituir el D-Ala terminal por lactato.

La estructura de menor energía obtenida era 10 kJ/mol menos estable que la obtenida para el complejo teicoplanina con AcLysDAlaDAlaOH. Este resultado se corresponde con los obtenidos previamente en el chip CM4 por SPR.

A pesar de estos resultados obtenidos tanto por SPR como por modelado molecular, dos de los derivados semisintéticos de la teicoplanina: la dalbavancina y el MDL 63,246, presentan una casi inapreciable, aunque existente, actividad frente a algunas cepas VRSE (Goldstein y *col.* 1995; Malabarba y *col.* 1995; Colabella y *col.* 2008), por lo que la principal diferencia estructural entre la vancomicina y los lipoglicopéptidos, sus cadenas hidrofóbicas deberían ser la causa de esa actividad. En el siguiente apartado se estudiará la interacción de los glicopéptidos con superficies hidrofóbicas que simulan el entorno de la superficie celular.

III.4.6. Análisis de interacción de glicopéptidos con superficies hidrofóbicas mediante SPR

Entre las diferencias estructurales que se pueden encontrar entre la vancomicina y lipoglicopéptidos como la teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246, destaca la presencia en estos últimos de una cadena hidrofóbica en la glucosamina unida al anillo D del heptapéptido (**Esquema 26**). Se ha atribuido que esta cadena permite a los lipoglicopéptidos anclarse a la membrana celular (Mackay, Gerhard, Beauregard, Westwell, y *col.* 1994). Para confirmarlo, se analizaron por SPR los diferentes glicopéptidos sobre un chip HPA según la metodología del apartado V.2.7.4.2.2.3. Este chip está cubierto por una superficie hidrofóbica compuesta por alcanotioles de cadena larga, por lo que es apropiado para simular el entorno de la membrana plasmática (**Figura 94A**). Los resultados (mostrados en la **Figura 94B**) sugieren que los lipoglicopéptidos presentan una interacción más fuerte con la superficie hidrofóbica de la que se obtiene con vancomicina, causado por su cadena lipofílica, sobretodo en el caso de MDL 63,246. La vancomicina, que no

presenta en su estructura cadenas de tipo hidrófobo, demostró una interacción muy baja con el chip.

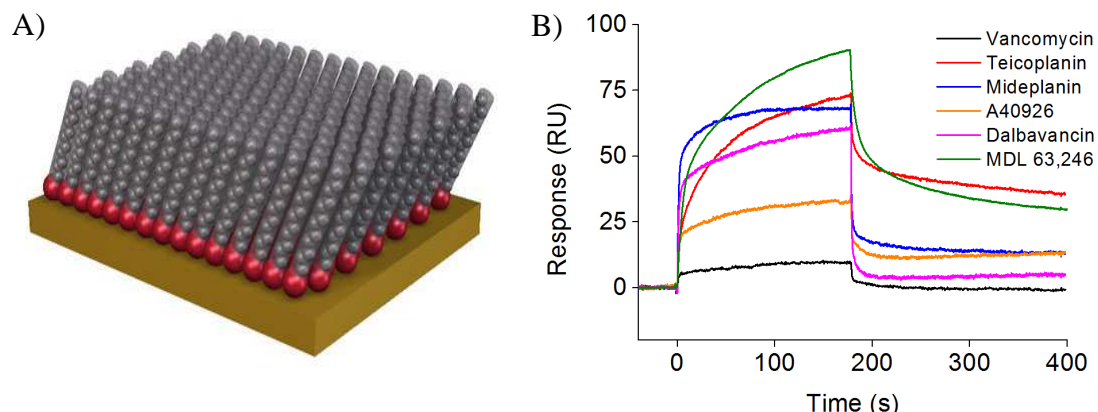


Figura 94. A) Representación de la superficie del chip HPA.(Dameron y col. 2007) B) Sensogramas de SPR de la unión de los glicopéptidos a la superficie hidrofóbica del chip HPA, mostrando las fases de asociación y disociación.

Los resultados obtenidos en los experimentos con el chip CM4 y el HPA confirman que la efectividad farmacológica de estas moléculas está directamente relacionada con su capacidad para unirse a los precursores de peptidoglicano de la pared bacteriana, la posibilidad de formar dímeros en la superficie estabiliza esta unión y poder anclarse a la membrana celular con sus cadenas lipofílicas la refuerza. La mayor interacción de los lipoglicopéptidos semisintéticos se podría relacionar con la menor Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que necesitan estas moléculas para actuar contra estafilococos coagulasa negativos, estreptococos y enterococos (Goldstein y col. 1995; Malabarba y col. 1997; Candiani y col. 1999; Colabella y col. 2008). El hecho de que solo dos de los lipoglicopeptidos, los derivados semisintéticos dalbavancina y MDL 63,246, presenten actividad, aunque muy baja, frente a cepas VRSE (Goldstein y col. 1995; Malabarba y col. 1995; Colabella y col. 2008), indica que la capacidad de anclaje de estas moléculas a la membrana celular, gracias a sus cadenas lipofílicas, es capaz de compensar la pérdida de afinidad por el precursor de peptidoglicano Lys-D-Ala-D-Lactato (**Figura 9** del apartado I.1.3.2).

En este estudio se ha demostrado, gracias a la obtención de un modelo de unión bivalente a la superficie del chip CM4, que los lipoglicopéptidos también dimerizan al unirse a los precursores de peptidoglicano, efecto que hasta ahora se consideraba exclusivo de los glicopéptidos no lipofílicos, como la vancomicina (**Figura 95A**) (Gerhard y *col.* 1993; Mackay, Gerhard, Beauregard, Westwell, y *col.* 1994; Schafer y *col.* 1996; Beauregard y *col.* 1997; Nitani y *col.* 2009). Los lipoglicopéptidos, además de anclarse a la membrana plásmática mediante sus cadenas hidrofóbica (**Figura 95B**), también dimerizan entre sí, generando un nuevo modelo de interacción no considerado hasta la fecha (**Figura 95C**). Estos dos efectos contribuyen de forma sinérgica a la actividad antibiótica de estas moléculas, lo que puede ser aprovechado para la búsqueda de mejores fármacos contra los organismos resistentes.

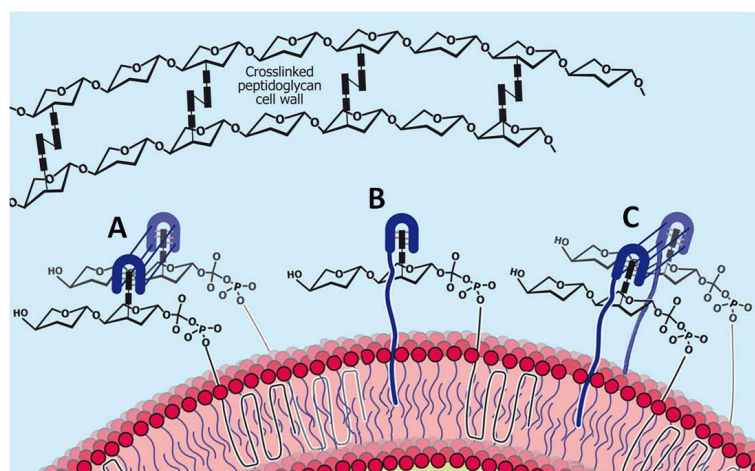


Figura 95. (A) Dimerización de la vancomicina al unirse a los precursores de peptidoglicano. (B) Anclaje de los lipoglicopéptidos a la membrana celular mediante su cadena hidrofóbica. (C) Modelo de unión propuesto para los lipoglicopéptidos que combina el anclaje a la superficie con la dimerización

IV. CONCLUSIONES

IV. Conclusiones

Una vez presentados los resultados obtenidos y considerando los objetivos propuestos en la realización de éste trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

1. Se ha llevado a cabo una búsqueda de microorganismos productores glicosidasas en una colección de 122 ejemplares. De las actividades obtenidas, se purificó por primera vez una β -fucosidasa de la bacteria *Cellulomonas gélida*, cuya producción es inducible por celobiosa y presenta una elevada actividad en la hidrólisis de residuos de β -fucosa en condiciones mesófilas (309,63 UI/mg).
2. Se ha realizado una búsqueda de enzimas glicosidasas y glicosiltransferasas en el genoma de la bacteria *Thermus thermophilus* PRQ25, de la que se clonaron seis genes candidatos en *E. coli* BL21 y *E. coli* Rosetta-Gami2, consiguiendo en esta última la correcta producción de todos ellos. Se ha obtenido por primera vez de esta cepa, una enzima α -glucosidasa con elevada actividad en la hidrólisis de residuos de α -glucosa en condiciones termófilas (257 UI/mg).
3. Se ha clonado en *E. coli* BL21 la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382, y caracterizado sus condiciones óptimas de reacción, obteniéndose un pH de 6 y una temperatura de 37 °C. En reacciones de transglicosidación presenta un rendimiento máximo del 51 % en la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc y del 49 % en la de Gal- β (1-3)-GalNAc a las 3h.
4. La presencia de disolventes sostenibles como co-solventes de la reacción, como los derivados de biomasa, potencian la especificidad de la reacción de transglicosidación de la enzima β -Gal-3 hacia la síntesis, llegándose a obtener un rendimiento en la producción de estos discáridos del 99 y del 95 % respectivamente con el derivado de dimetilamida S13, con una concentración óptima del co-solvente de 2 M.

5. El uso de LIs como co-solventes de la reacción de transglucosidación con la enzima β -Gal-3, también aumenta el rendimiento de la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc, llegándose a obtener con el [Bmim][PF₆], un rendimiento del 97 % en ambos disacáridos, con una concentración óptima del co-solvente del 30%.
6. Se ha desarrollado un proceso de escalado de la producción de los disacáridos, Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc en condiciones sostenibles, utilizando la enzima β -Gal-3, en presencia del derivado de biomasa S13 y el LI [Bmim][PF₆]. Se han puesto a punto las condiciones de recuperación de los co-solventes, posibilitando su reutilización, y la separación de los distintos productos de reacción, obteniéndose un rendimiento final después de la purificación del 85% con S13 y del 88% con [Bmim][PF₆].
7. Se ha estudiado el efecto del derivado de biomasa S13 y el LI [Bmim][PF₆] sobre la estructura de la enzima β -Gal-3, mediante técnicas de modelado molecular y espectroscopía de fluorescencia. Se ha concluido que en concentración 2 M y 30% respectivamente, estos co-solventes causan modificaciones estructurales que aumentan la afinidad del sustrato por el centro activo de la enzima, y disminuyen la afinidad de la fase acuosa por éstos, aumentando el tiempo que permanecen situados a distancia óptima de reacción.
8. Se ha inmovilizado la enzima β -Gal-3 utilizando dos estrategias, polímeros macroporosos activados con grupos epóxido y glioxil agarosas activadas con grupos aldehído, obteniéndose con éste último los mejores resultados, con una inmovilización total de la enzima y un mantenimiento de la actividad del 86% respecto a la enzima libre, llevando a cabo el proceso de inmovilización en presencia del agente estabilizador PEG-600.

9. En las reacciones de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa para la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc, se han obtenido unos rendimientos en condiciones de solo tampón de 34 y 30 % respectivamente, con S13 del 55 y 29%, y con [Bmim][PF₆] del 74 y 91% respectivamente.
10. La inmovilización de la enzima β -Gal-3 en glioxil agarosa permite la recuperación y reutilización del biocatalizador. En el reuso número 10, la enzima inmovilizada mantiene una actividad sintética reaccionando en medio con solo tampón del 55%, con S13 del 67%, y con [Bmim][PF₆] del 76%. En el reuso número 20 la enzima inmovilizada del medio con solo tampón y con S13 ya no eran activas, pero la enzima con [Bmim][PF₆] conservaba el 62% de actividad. En el reuso número 40, la enzima inmovilizada en medio con [Bmim][PF₆], conservaba el 30% de actividad.
11. El LI [Bmim][PF₆] utilizado como co-solvente de las reacciones con la enzima β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa, es el que ofrece mejores rendimientos en la síntesis de disacáridos, el que más reusos permite, y además, al no ser soluble en agua, se puede separar del medio de reacción por centrifugación, permitiendo su reutilización y aumentando la sostenibilidad del proceso.
12. La mutagénesis dirigida de los residuos catalíticos del centro activo de la enzima β -Gal-3 conlleva su inactivación. La sustitución del glutámico-233 (residuo nucleófilo) por glicina no genera una enzima con actividad glicosintasa, y es que hasta la fecha, no existe la descripción de ningún glicosintasa derivada de ninguna glicosidasa de la familia GH35, a la que pertenece la Gal-3.
13. La mutagénesis del extremo C-terminal de la enzima TmGalA de *Thermotoga maritima*, y su derivada glicosintasa (TmGalA D327G), en su extremo C-

- terminal para añadir una cola de histidinas, simplifica el proceso de purificación y no afecta a su actividad, comparada con su versión sin cola.
14. Se ha utilizado la enzima mutante TmGalA D327G para la síntesis de los glicoconjugados Gal- α (1-6)-Glu- α -pNF y Gal- α (1-6)-Man- α -pNF, obteniéndose una conversión del sustrato de partida del 55 y del 57%, y un rendimiento en síntesis de los glicoconjugados del 35 y 25% respectivamente
 15. Se ha evaluado por primera vez el efecto de los disolventes sostenibles sobre una enzima glicosintasa, utilizándolos como co-solventes de la TmGalA D327G en la síntesis de los glicoconjugados Gal- α (1-6)-Glu- α -pNF y Gal- α (1-6)-Man- α -pNF. Los derivados de biomasa han demostrado no ser co-solventes apropiados para esta glicosintasa, debido a los bajos resultados de conversión obtenidos. Por otro lado, los LI han mejorado el rendimiento de síntesis, obteniéndose los mejores resultados con el [Troma][Ntf₂], obteniéndose una conversión del sustrato de partida del 98 y 97%, y un rendimiento en síntesis del 49 y del 80% respectivamente.
 16. Se han utilizado dos enzimas sialiltransferasas, la α 2,6SiaT de *Photobacterium leiognathi* y la α 2,3SiaT de *Photobacterium phosphoreum*, para la funcionalización con derivados de ácido siálico (Neu5Ac y Neu5Gc) de seis glicodendrimeros de multivalencia variable. La enzima α 2,6SiaT fue capaz de completar la reacción con todos los glicodendrimeros, pero la α 2,3SiaT solo generó productos intermedios. El rendimiento final de los doce productos purificados varió entre el 42 y el 54% respecto al glicodendrimeros de partida.
 17. La modificación estructural de antibióticos de tipo glicopéptido mediante enzimas de tipo glicosidasa, lipasa, glucosa oxidasa y serín proteasa no ha mostrado resultado positivos, evidenciando la dificultad de encontrar enzimas que reconozcan este tipo de moléculas.

18. El análisis mediante SPR y modelado molecular de la interacción entre antibióticos de tipo glicopéptido y los derivados de peptidoglicano, y el estudio de su unión a superficies hidrofóbicas, demostró por primera vez que los lipoglicopéptidos son capaces de dimerizar entre sí, no en solución, sino cuando se unen al precursor de peptidoglicano, aumentando la estabilidad de la unión de forma sinérgica. Esto crea un nuevo modelo de acción para estos antibióticos, según el cual, la efectividad farmacológica de estas moléculas está directamente relacionada con su capacidad para unirse a los precursores de peptidoglicano de la pared bacteriana, donde la posibilidad de formar dímeros en la superficie estabiliza esta unión y poder anclarse a la membrana celular con sus cadenas lipofílicas la refuerza.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Materiales

V.1.1. Reactivos y disolventes

V.1.1.1. General

Todos los reactivos se obtuvieron de diferentes casas comerciales y se usaron directamente sin necesidad de purificación previa: Bio-Rad, Fisher, Fluka, Merck, Pierce, Scharlau, SDS, Sigma-Aldrich.

Los estándares de azúcares y otros reactivos utilizados en la presente Tesis Doctoral, fueron, en su mayoría, adquiridos de Sigma-Aldrich: *p*-nitrofenol (*p*NF), *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -Gal), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p*NF- β -Glu), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosido (*p*NF- β -Fuc), *N*-acetil-D-lactosamina (Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc), D-(+)-galactosa (Gal), D-(+)-manosa (Man), D-(+)-fucosa (Fuc), D-(+)-fructosa (Fru), D-(+)-glucosa (Glu), clorhidrato de D-glucosamina (GluNH₂), clorhidrato de D-galactosamina (GalNH₂), *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), 4-metilumbeliferil- β -D-fucopiranosido, (Fuc- β -MU), 1-desoxi-1-fluoro- α -D-galactopiranosido (Gal- α -F), β -D-galactopiranosil-azida (Gal- β -N₃) fosfato dihidrógeno de sodio, fosfato hidrógeno de sodio, citrato de sodio, ácido cítrico, hidróxido de sodio.

V.1.1.2. Electroforesis

Los siguientes reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y análisis de proteínas fueron comprados a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA): dodecil sulfato de sodio para electroforesis (SDS), *tris*-(hidroximetil)aminometano (Tris), glicina, persulfato de amonio (PSA), page blue 83 (tinción para geles), glicerol para uso en biología molecular y el estándar de albúmina de suero bovina 98%. Mientras que los siguientes reactivos fueron comprados a la casa comercial de BioRad: Dye Reagent (tinción para método Bradford), solución de bis acrilamida

29:1 (40%), tetrametiletilendiamina (Temed), estándares de peso molecular de electroforesis (Kaleidoscope, dual color y SDS-PAGE standards broad range).

V.1.1.3. Resonancia de Plasmón de Superficie

Los estudios de interacción mediante esta técnica se realizaron en un aparato BIAcore-3000 (Biacore). Los datos se analizaron empleando BIAEvaluation software versión 4.1, 2003 (Biacore).

Los Chips para inmovilización de ligandos en SPR, surfactantes y el kit de unión covalente (amino coupling kit) fueron de GE Healthcare, Uppsala, Suecia.

V.1.1.4. Disolventes derivados de biomasa

Los disolventes obtenidos de fuentes renovables derivados de glicerol (García y col. 2010): 1,3-dimetoxipropan-2-ol (S4), 2-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (S5), 1-*tert*-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (S6), 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (S7), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (S8), 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (S9), 1-butoxi-3-isobutoxipropan-2-ol (S10), 1,3-dibutoxipropan-2-ol (S11), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (S12), fueron proporcionados por el Prof. Dr. José I. García del Instituto de Ciencias Materiales de Aragón perteneciente al CSIC, Zaragoza.

Otros disolventes fueron: i) derivados cíclicos de glicerol: 1,3-dioxan-5-ol (S1), 5-hidroxi-1,3-dioxan-2-ona, (S2) y (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-1-il)metanol (S3) y ii) derivados de dimetilamida: 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (S13), *N,N*-dimetilbenzamida (S14), *N,N*-dimetilhexanamida (S15). Estos fueron proporcionados por la empresa COGNIS IP Management GMBH (Alemania)

V.1.1.5. Líquidos Iónicos (LI)

Los LI: hexafluorofosfato bistriflimida de trioctilmetilamonio [Troma][NTf₂], metilsulfato de cocosalquil pentaetoxi metil amonio [CPMA][MeSO₄], hexafluorofosfato de octil metil imidazolio [Omim][PF₆], hexafluorofosfato de butil metil imidazolio [Bmim][PF₆], tetrafluoroborato de etil metil imidazolio [Emim][BF₄], *tris*-(pentafluoroetil)trifluorofosfato de butil metil imidazolio [Bmim][FAP], fueron adquiridos de Meck-Chemicals (Alemania).

V.1.1.6. Soportes para inmovilización:

Los soportes utilizados para inmovilización fueron: i) Eupergit CM comprado a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), ii) soportes macroporosos funcionalizados con grupos epóxidos, que fueron preparados y caracterizados en nuestro grupo de investigación por el Dr. Antonio Aires como parte de su Tesis Doctoral (Aires-Trapote 2012). iii) glioxil agarosas, que fueron cedidas por el grupo del Dr. José Manuel Guisán.

V.1.1.7. Glicodendrimeros

Se utilizaron diferentes glicodendrimeros que fueron sintetizados y caracterizados en nuestro grupo de investigación por el Doctorando Mario Kaspar-Deir como parte de su Tesis Doctoral (en preparación)

V.1.1.8. Glicopéptidos

Los glicopéptidos vancomicina, teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 fueron suministrados por el grupo del Dr. Francesco Molinari, Sección de Microbiología Industrial del Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentaria y Microbiológica, Universidad de Estudios de Milán (Italia).

V.1.2. Microorganismos y plásmidos

Se llevó a cabo la búsqueda de microorganismos productores de glicosidasas a partir de una colección de 122 bacterias del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense (Colección BTG). Estos organismos no estaban identificados por lo que no se conocía su especie, condiciones óptimas de crecimiento o a existencia de actividad frente a diferentes carbohidratos.

La cepa PRQ25 de *Thermus thermophilus* (da Costa 2001), fue cedida por el grupo del Dr. José Berenguer. El genoma de esta cepa ha sido secuenciado y anotado por su grupo de investigación (Alvarez y col. 2011).

La cepa ATCC 31382 de *Bacillus circulans* fue adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Los procedimientos relativos al clonaje y mutagénesis de enzimas se realizaron en el laboratorio del Dr. José Berenguer del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) ubicado en el Campus de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), con la ayuda de la Dra. Laura Álvarez y el Dr. Aurelio Hidalgo.

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan 1983) se utilizó para amplificar y reproducir plásmidos. Las enzimas recombinantes se expresaron en *E. coli* BL21 y en *E. coli* Rosetta-Gami2 (Tabla 28). Como vectores se utilizaron los plásmidos pET28b(+), pET22b(+) y el pET24d(+) (Tabla 29).

Tabla 28. Cepas de *Escherichia coli* empleadas para la transformación con plásmidos recombinantes

Microorganismo	Características genotípicas o fenotípicas destacables	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> ($r_k^- m_K^+$) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\Delta(lacaya-argF)$ U169 λ^-	Novagen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-Gami2	$\Delta(ara-leu)$ 7697 $\Delta lacX74$ $\Delta phoA$ <i>PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[<i>lac⁺ lacI^f pro</i>] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxBpRARE2</i> (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen

Tabla 29. Plásmidos empleados para la obtención de proteínas recombinantes.

Plásmido	Características	Referencia
pET28b(+)	Kan ^R f1Ori T7p <i>lacI</i> tamaño: 5,3kb	Novagen
pET22b(+)	Amp ^R f1Ori T7p <i>lacI</i> tamaño: 5,5kb	Novagen
pET24d(+)	Kan ^R f1Ori T7p <i>lacI</i> tamaño: 5,3kb	Novagen

V.1.3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron suministrados por Sigma (EEUU). En la Tabla 30 se muestran los oligos empleados para la amplificación de los genes de *Thermus thermophilus* PRQ25, *Bacillus circulans* y *Thermotoga maritima*.

Tabla 30. Oligonucleótidos utilizados para amplificación en PCR.

NOMBRE	SECUENCIA
PRQ25_0443FW	5'-AAAA CATATG GCGCCTTTGAGGATGAAG-3'
PRQ25_0443RV	5'-AAAA GAATTC ATCGCGTCCAGAAGAG-3'
PRQ25_0528FW	5'-AAAA CATATG GACCCCTCTGGTACAAG-3'
PRQ25_0528RV	5'-AAAA GAATTC TAGGCTTTACCGGCCTTG-3'
PRQ25_0794FW	5'-AAAA CATATG GCGCGCTTCGCCC-3'
PRQ25_0794RV	5'-AAAA GAATTC AAGCCCCCTCTTGGAGGTAG-3'
PRQ25_1525FW	5'-AAAA CATATG TTTCGGCCTCGGGTGG-3'
PRQ25_1525RV	5'-AAAA GAATTC ACGGCCGCCCTCC-3'
PRQ25_1926FW	5'-AAAA CATATG GGCGTTATGCGCGTG-3'
PRQ25_1926RV	5'-AAAA GAATTC CTAGCCCAAGGCCTCC-3'
PRQ25_2319FW	5'-AAAA CATATG CACCAGCCCCCTTACG-3'
PRQ25_2319RV	5'-AAAA GAATTC TAGGGCCAGGCCACG-3'
B-gal-3-FW	5'-GAATAACACATAATTTACGGG-3'
B-gal-3-28RV	5'-ATGCA AAGCTT ATTTCAAGGTG-3'
B-gal-3-22RV	5'-TTTA AAGCTT AGGTGTTTTTGGT-3'
B-gal-3-E157G-FW	5'-ATTGCTTTGCAAATTGAGAATGGGTACGGAAGTTTGGAAATGAC-3'
B-gal-3-E157G-RV	5'-GTCATTTCCAAAACCTCCGTACCCATTCTCAATTTGCAAAGCAAT-3'
B-gal-3-E233G-FW	5'-CTCCTCTAATGTGCATGGGATTTTGGCATGGTTGGTT-3'
B-gal-3-E233G-RV	5'-AACCAACCATGCCAAAATCCCATGCACATTAGAGGAG-3'
TmGalA-HisTag-FW	5'-ACGAAGAGGGTGAGAGAGAAAAGCTTGCGGC-3'
TmGalA-HisTag-FW	5'-GCCGCAAGCTTTTCTCTCTCACCCCTCTTCGT-3'

En verde se indica la diana para la enzima de restricción *NdeI*, en azul la diana para la enzima de restricción *EcoRI* y en morado la diana para la enzima de restricción *HindIII*

V.1.4. Enzimas

Las enzimas empleadas en este trabajo fueron:

- β -fucosidasa de *Cellulomonas gélida*, producida en el laboratorio.
- α -galactosidasa de *Thermus thermophilus* PRQ25, producida en el laboratorio.
- β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382, producida en el laboratorio.

- TmGalA y TmGalA D327G de *Thermotoga maritima*, plásmidos cedidos por el grupo del Dr. Marco Moracci, del Instituto de Bioquímica de Proteínas de Nápoles (Italia) y producida en el laboratorio.
- α 2,6SiaT de *Photobacterium leiognathi*, α 2,3SiaT de *Photobacterium phosphoreum* y CSS de *Neisseria meningitidis*, producidas durante una estancia científica en el laboratorio del Dr. Woody Fessner, Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Universidad de Darmstadt (Alemania).
- Fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina, Fluka.
- Pirofosfatasa inorgánica, Sigma-Aldrich
- Ácido N-acetil neuramínico aldolasa, Sorachim.
- Lipasas de *Candida rugosa* y *Pseudomonas stutzeri*, Sigma-Aldrich.
- Subtilisina de *Bacillus subtilis*, Sigma-Aldrich.
- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich.
- Catalasa, Sigma-Aldrich.
- N-acetil-hexosaminidasa: *Canavalia ensiformis*, *Aspergillus oryzae* y riñón bovino, Sigma-Aldrich.
- Pfu polimerasa y Tth polimerasa, Promega.
- Endonucleasas de restricción *DpnI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, New England Biolabs.

V.2. Procedimientos generales

V.2.1. Métodos microbiológicos

V.2.1.1. Medios de cultivo

La composición de los distintos medios de cultivo usados fue la siguiente:

-Caldo Cerebro-corazón enriquecido con glucosa:

Medio rico utilizado para revitalizar cepas microbianas

30 g/l de infusión cerebro-corazón.

Glucosa 2 %

El medio fue esterilizado en autoclave (modelo Presoclave 75 de P Selecta) a 115 °C durante 15 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB (Luria-Bertani) (Miller 1972):

Medio rico utilizado para el crecimiento de cepas bacterianas

Peptona 1 %

Extracto de Levadura 0,5 %

Cloruro sódico 0,5 %

El pH del medio se ajustó a 7, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB enriquecido con glucosa:

Medio rico en el que la glucosa se usa para reprimir catabólicamente la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de *Plac*, y así tener el control sobre el momento de la expresión de la proteína y poder evitar, en la medida de lo posible, reacciones de toxicidad durante el crecimiento del cultivo.

Peptona 1 %

Extracto de Levadura 0,5 %

Cloruro sódico 0,5 %

Glucosa 0,5 %

El pH del medio se ajustó a 7, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB-agar:

Medio sólido utilizado para el crecimiento en placa.

30 gr/l de LB-agar

El medio, introducido en una botella de vidrio pyrex, fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta unos 60 °C, fue dispensado en placas petri estériles y conservado a 4 °C.

-Medio TB: (Ramirez-Arcos y cols.,1998)

Tryptona 0,8 %

Medio utilizado para el crecimiento de microorganismos termófilos

Extractode levadura 0,4 %

Cloruro Sódico 0,3 %

El pH del medio se ajustó a 7,5, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

-Medio SOC (Maniatis y *col.* 1982):

Medio utilizado para la expresión de la resistencia a antibióticos después de una transformación.

Tryptona 2 %

Extracto de levadura 0,5 %

Cloruro sódico 0,05 %

Cloruro potásico 0,02 %

El pH del medio se ajustó a 7, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez enfriado se añadieron por microfiltración y en condiciones de esterilidad 10 mL de glucosa 2 M y 10 mL de MgCl₂ 1 M.

V.2.1.2. Revitalización y mantenimiento de la colección BTG

V.2.1.2.1. Revitalización

Los microorganismos fueron suministrados en forma de criotubos, en una suspensión con glicerol al 20% y congelados a -80 °C. Se descongeló cada criotubo y se tomó una alícuota de 100 µl que fue introducida en un matraz con 15 ml de medio cerebro-corazón enriquecido con glucosa. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 30 °C y a una agitación de 180 revoluciones por minuto (r.p.m.) en un incubador Unitron HT Infors con agitación orbital. Los matraces fueron observados cada 24 horas para ver si había aparecido la turbidez característica del crecimiento microbiano.

De cada matraz crecido se tomó una alícuota de 100 µl y se traspasó a una placa de medio LB-agar y extendida para su crecimiento en césped, para lo que se incubó en estufa a 30 °C. Posteriormente se realizó una inoculación en placa mediante la técnica de agotamiento de asa para comprobar la pureza de los cultivos.

V.2.1.2.2. Conservación de colección BTG

Se tomó una alícuota de 100 µl de cada matraz crecido en caldo cerebro-corazón enriquecido con glucosa, la cual se utilizó para inocular un matraz con 15 ml de medio LB líquido, incubado a 30 °C y a 180 r.p.m durante 24 horas en un incubador Unitron HT Infors con agitación orbital.

-Congelación: En criotubos estériles, en condiciones de esterilidad se introdujeron 800 µl del medio crecido y se añadieron 200 µl de glicerol estéril (para una concentración final del 20 %). Cinco criotubos de cada microorganismo se almacenaron a -20 °C y otros tres se almacenaron a -80 °C.

-Liofilización: En condiciones estériles se introdujeron 800 µl del medio crecido y se añadieron 200 µl de leche desnatada sin calcio, utilizando algodón estéril como tapón. Los criotubos se congelaron a -80 °C y posteriormente fueron liofilizados. En condiciones estériles se sustituyó el algodón por un tapón de rosca estéril. Se conservaron a 4 °C.

V.2.1.3. Crecimiento de microorganismos

V.2.1.3.1. Colección BTG

En condiciones estériles, un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB se inoculó con 100 µl del contenido de un criotubo guardado a -20 °C Se incubó a 30 °C y a 180 r.p.m. durante 16 horas.

V.2.1.3.2. *T. Thermophilus* PRQ25

En condiciones estériles, un matraz de 250 ml con 50 ml de medio TB diluido a la mitad, se inoculó con el contenido de un criotubo guardado a -20 °C Se incubó a 65 °C y a 180 r.p.m. durante 16 horas.

V.2.1.3.3. *E. coli* recombinante

En condiciones estériles, un matraz con medio LB se inoculó con 100 µl del contenido de un criotubo guardado a -80 °C Se incubó a 37 °C y a 180 r.p.m. durante 16 horas. Cada matraz llevaba el antibiótico de selección para el cual la cepa de *E. coli* recombinante presentaba resistencia, según las concentraciones de la Tabla 31

Tabla 31. Atibióticos utilizados para el crecimiento de cepas de *E. coli* recombinante.

Antibiótico	Concentración (mg/ml)
Ampicilina	100
Kanamicina	30
Cloranfenicol	20

V.2.1.4. Transformación bacteriana

V.2.1.4.1. Choque térmico

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el método descrito por Inoue (1990) y se conservaron en alícuotas de 50 µl en tubos de 1,5 mL a -80°C.

La transformación de las cepas *E. coli* DH5α y BL21 se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Inoue (1990). Se tomó una alícuota de células competentes, manteniéndola en todo momento a 4°C, y se añadió el DNA purificado en un volumen no superior al 5% del total. Se mantuvieron las células a 4°C durante 30 min y a continuación se introdujeron en un baño con agua a 42°C, sin agitación, durante 90 segundos, transfiriéndose inmediatamente a 4°C. A continuación se añadieron 800 µL de medio LB a las células, se mezclaron suavemente por inversión,

y se incubaron a 37°C y 150 r.p.m. para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico, durante una hora en caso de la ampicilina y dos horas en caso de la kanamicina. Transcurrido el tiempo, se pipetearon distintos volúmenes en placas conteniendo el antibiótico de selección adecuado, añadiendo esferas de vidrio para la correcta dispersión del líquido sobre la superficie. Tras retirar las esferas, las placas se incubaron a 37 °C.

V.2.1.4.2. Electroporación

La electroporación fue el método preferente para la transformación en *E. coli* Rosetta-Gmai2. La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo con el método propuesto por el fabricante del electroporador (Micropulser, BioRad). Para ello, se centrifugó un cultivo de 500 mL en LB cuando alcanzó una DO₆₀₀= 0,5-0,7. (Nota: a partir de este momento, todo el proceso se realizó lo más cerca posible de 0°C) Las células se resuspendieron suavemente en 500 mL de glicerol 10% (p/v), y se centrifugaron a 4.000 x g durante 15 min. Se repitió el proceso con 250, 20 y 1 mL de glicerol 10% y se distribuyó el volumen final en alícuotas de 50 µL para su conservación a -80°C.

La transformación se realizó añadiendo DNA purificado y desalado a 50 µL de células electrocompetentes, manteniendo la mezcla a 4°C durante 30 min, tras lo cual se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada. El programa de electroporación se eligió siguiendo las indicaciones del fabricante, evitando pulsos de más de 5 ms. Tiempos más largos indican una elevada concentración de sales en la muestra y producen daños en las células, reduciéndose dramáticamente la eficiencia de transformación. Inmediatamente tras el pulso, se añadieron 800 µL de medio SOC atemperado a las células, se transfirieron a tubos de 1,5 mL y se cultivaron a 37°C para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico, durante una hora en caso de la ampicilina y dos horas en caso de la kanamicina. Transcurrido el tiempo, se pipetearon distintos volúmenes en placas conteniendo el antibiótico de selección adecuado, añadiendo esferas de vidrio para la

correcta dispersión del líquido sobre la superficie. Tras retirar las esferas, las placas se incubaron a 37 °C.

V.2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Una vez obtenidas, las construcciones fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-Gami2, se crecieron en medio LB a una temperatura que osciló entre los 21 y los 37°C en función de las características de la proteína, en presencia del antibiótico frente al que la cepa presentara resistencia. Al medio se añadió un 0,5% de glucosa para reprimir catabólicamente la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de *Plac*, y así tener el control sobre el momento de la expresión de la proteína y poder evitar, en la medida de lo posible, reacciones de toxicidad durante el crecimiento del cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron una DO550 de 0,6-0,9, una vez más dependiendo de la expresión de la proteína, se indujo la expresión del promotor *Plac* con una concentración de IPTG de 1 mM y se mantuvo en agitación entre 5 y 16 h, a la temperatura correspondiente.

V.2.1.6. Rotura de microorganismos

La rotura de células de los microorganismos utilizados se realizó en un procesador ultrasónico (sonicador) modelo LABSONIC M de la casa Sartorius y en un sonicador Branson Sonifier 450. La ruptura se realizó en 10 ciclos de 25 segundos en tubos de vidrio (Corex) o en su defecto de plástico (Falcon). En todos los casos se realizó sobre un baño de hielo para evitar calentamientos. La intensidad de cada sonicación fue de aproximadamente 12.000 microns (intensidad referida entre pico y pico).

V.2.2. Manipulación de DNA

V.2.2.1. Preparación de DNA total

El DNA de bacteriano fue aislado a partir de 2-10 ml de cultivo en fase estacionaria, siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial DNeasy Blood & Tissue de

Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante. Mediante este protocolo se obtienen habitualmente fragmentos de DNA de un tamaño medio de 25 kpb, apropiados para ser utilizados como molde en ensayos de PCR.

V.2.2.2. Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

La obtención del DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos saturados de *E. coli*, utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook 1989) o bien, cuando la pureza requerida para el DNA era mayor, utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps de Promega.

V.2.2.3. Técnicas de amplificación de DNA por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Para la amplificación de DNA se utilizó la DNA polimerasa de *T. thermophilus* (Biotools B&M), y en determinados casos se añadió la de *Pyrococcus furiosus* (Roche Molecular Biochemicals o Biotools B&M), en una relación 3:1 para aumentar la fidelidad del fragmento amplificado. Se utilizó 1 unidad de la enzima, con el tampón suministrado por la casa comercial, entre 0 y 8 % DMSO, entre 3 y 5 mM de Cl_2Mg , 0,5 mM de una mezcla igualada de dNTP y 50 pmol de cada oligonucleótido (Isogen y Sigma-Aldrich), cuya secuencia se muestra en la **Tabla 30** del apartado V.1.3, con un volumen final de reacción de 50 μl . Para la amplificación se ha utilizado el modelo iCycler de Bio-Rad. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y colaboradores (Ausubel 1994).

V.2.2.4. Clonaje de genes

La digestión del DNA, tanto del procedente de una PCR como del plasmídico, fue realizada siguiendo las condiciones de tampón, temperatura y concentración, recomendadas por la casa suministradora para cada una de las diferentes enzimas de restricción utilizadas, NdeI en 5' y HindIII o EcoRI en 3' (MBI Fermentas). La

ligación de fragmentos de DNA fue llevada a cabo con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs), utilizando las condiciones recomendadas por la casa comercial, con 0,5 unidades en un volumen final de 10 µl, ajustando la relación vector:inserto a 1:4. Las muestras fueron incubadas a 16 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas ligaciones fueron utilizadas para transformar 50 µl de células competentes (apartado V.2.1.4).

V.2.2.5. Protocolo Quick-Change para generación de mutantes puntuales

Para la realización de mutaciones puntuales, se utilizó el kit QuikChange II Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene). Se amplificó por PCR (apartado V.2.2.3) el gen a mutar junto con el plásmido correspondiente en el que estuviera clonado, con la enzima Pfu plus (Eurx), utilizando los oligonucleótidos correspondientes portadores de la mutación (**Tabla 30**). Las condiciones de PCR utilizadas se muestran en la **Tabla 32**. Una vez finalizada, se utilizó la enzima de restricción *DpnI*, que digiere DNA metilado, para eliminar el DNA molde no mutado, en una reacción que dura 2 horas a 37 °C. A continuación se transformaron células de *E. coli* DH5α con el resultado de la digestión y se seleccionaron los mutantes (apartado V.2.1.4.1).

Tabla 32. Condiciones de PCR utilizadas en el protocolo Quick-Change.

Ciclo 1: (1x)	- 4 °C ∞ min
- 95 °C 2 min	
Ciclo 2: (16x)	
- 94 °C 0,5 min	
- 55 °C 1 min	
- 68 °C 1 min por kpb	
Después del ciclo 10 se incrementa en 20 s cada ciclo.	
Ciclo 3: (1x)	
- 68 °C 10 min	
Ciclo 4: (1x)	
Componente	Concentración final
Tampón Pfu 10X	10 % (v/v)
Pfu plus polimerasa	0,5 µl
dNTPs	1 mM (cada uno)
Oligonucleótido FW	0,5 mM
Oligonucleótido Rv	0,5 mM
DNA molde	0,3 ng.µl ⁻¹

DMSO	2 % (v/v)
mqH ₂ O	hasta 50 µl

V.2.2.6. Secuenciación de DNA

El DNA (plasmídico o procedente de PCR) fue secuenciado de forma automática mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger y *col.* 1977) en el servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid.

V.2.2.7. Electroforesis de en geles de agarosa y purificación de DNA

Para analizar el peso molecular de los plásmidos, fragmentos y ligaciones de DNA se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Para ello se midieron 40 mL del tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA disódica 2 mM y ácido acético glacial 0,1142 % v/v), se les adicionaron 0,32 g de agarosa y se calentó la mezcla hasta fundir. Antes de que la disolución gelificara, se le adicionaron 10 µL de bromuro de etidio (1 mg/mL). Se vertió la mezcla en la cámara ensamblada y se enfrió hasta endurecer. Se adicionó disolución de TAE 1X hasta cubrir ligeramente el gel de agarosa. Se tomaron entre 5 y 15 µL de tampón de carga y se mezclaron con 5 µL de muestra de DNA. Se colocó la muestra de DNA-Tampón de carga en los pocillos del gel. Se colocó una muestra de marcadores de DNA en uno de los pocillos. Finalmente las muestras se sometieron a una diferencia de potencial eléctrico de 90 V para iniciar la electroforesis. Los resultados se revelaron con luz ultravioleta.

La purificación de fragmentos de DNA de bandas cortadas de los geles de agarosa se llevo a cabo mediante el kit PCR-Prep QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

V.2.3. Manipulación de proteínas

V.2.3.1. Cuantificación de Proteínas

Se determinó la cantidad de proteína presente en las disoluciones según el método de Bradford (1976), que se basa en la variación en el espectro de absorción visible del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en presencia de una proteína. La adsorción de proteína provoca que el valor del máximo de absorción se desplace de 465 nm a 595 nm. La preparación del reactivo de Bradford se llevó a cabo partiendo de un concentrado comercial de Bio-Rad (Dye reagent) siguiendo las instrucciones del fabricante (dilución 1:5 para el método estándar y sin dilución para el método micro). Como patrón de proteína se utilizó una solución de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración 0,75 mg/mL en agua milli Q o en el tampón de muestra, según fuera el caso. Se realizaron disoluciones sucesivas de la proteína patrón como se muestra en la Tabla 33, completándose con agua milliQ (o tampón) hasta un volumen total de 0,1 mL. A continuación se añadieron 5,00 mL de reactivo de Bradford y se homogenizó la mezcla. La adsorción de la proteína al colorante se produce instantáneamente siendo máxima y estable entre los 5 y 20 primeros minutos. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado según la tabla de dilución utilizada (**Tabla 33**).

Tabla 33. Disoluciones sucesivas de proteína patrón para realizar la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Nº	µL de Proteína (1 mg/mL)	µL de Agua MilliQ	mL de Bradford	BSA (µg/mL)
0 *	0	100	5,00	0
1	20	80	5,00	2,94
2	30	70	5,00	4,41
3	40	60	5,00	5,88
4	50	50	5,00	7,35
5	60	40	5,00	8,82
6	70	30	5,00	10,29
7	80	20	5,00	11,76

8	90	10	5,00	13,23
9	100	0	5,00	14,71

* El valor de cero se midió para establecer el blanco de trabajo en la recta de calibrado, pero este valor no se representó puesto que no está ubicado en el rango lineal de éste método.

Los resultados de absorbancia en función de la concentración de proteína, en $\mu\text{g/ml}$ para el volumen final de 5,10 mL, se ajustaron por regresión lineal al modelo de una recta de primer grado, cuya linealidad se valoró según el valor de R^2 .

V.2.3.2. Electroforesis de proteínas

V.2.3.2.1. Electroforesis de en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Para analizar la pureza de las proteínas y el peso molecular de las mismas, utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida basada en el método de Laemmli (1970). Se usaron geles de separación de 12,5 % de acrilamida preparados con 1,25 de bis:acrilamida (29:1 al 40%) respectivamente, 1 mL de tampón Tris-HCl pH 8,80 1,50 M, 1,69 de agua destilada, 40 μL de SDS al 10%, 10 μL de Temed y 30 μL de PSA. Para los geles de acrilamida de 7,5% se utilizó 0,75 mL de *bis*-acrilamida y 2,19 mL de agua destilada, las demás concentraciones de reactivos fueron iguales a las descritas anteriormente. El gel concentrador utilizado fue al 3% de acrilamida. Se preparó utilizando 150 μL de bisacrilamida (29:1 al 40 %), 1 mL de tampón Tris-HCl pH 6,80 0,50 M, 822 μL de agua destilada 18 μL de SDS al 10 %, 5 μL de Temed y 15 μL de PSA.

Las muestras con proteínas se mezclaron en proporción 1:1 (v:v) con tampón de carga, que se preparó con 773 μL de SDS al 10 %, 613 μL de Tamón Tris-HCl 0,50 M pH 6,80, 233 μL de β -mercaptoetanol, 400 μL de glicerol y 0,8 mg de azul de bromofenol. Una vez mezcladas con el tampón de carga, se calentaron a 96°C durante 10 min y se centrifugaron 3 min. El líquido remanente se cargó en los geles y se corrieron a 175V en tampón de electroforesis (30,3 g SDS, 144 g tris, 10 g de glicina,

1L de agua destilada). El revelado de los geles se alcanzó con una disolución del tinte comercial Page Blue 83 al 0,1% (metanol: agua: ácido acético, 5:4:1) y se destiñó con la misma mezcla sin Page Blue 83.

V.2.3.2.2. Electroforesis de proteínas en condiciones nativas

Se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado V.2.3.2.1 suprimiendo el uso de agentes desnaturizantes (SDS y β -mercaptoetanol) y sin llevar a cabo la desnaturización a 96 °C de las muestras previa a la carga del gel.

V.2.3.3. Purificación de β -fucosidasa de *C. gelida*

V.2.3.3.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Esta técnica se utilizó como primer paso para la purificación de la enzima β -fucosidasa de *C. gelida*.

V.2.3.3.1.1 Actividad en sulfato amónico

Puesto que las proteínas se precipitaron con sulfato amónico en distintos porcentajes de concentración, es necesario comprobar que esta sal no provoca la inactivación de la enzima. Para ello se llevó a cabo la reacción tal y como se explica en el apartado V.2.4.1.2, habiendo añadido previamente una concentración del 50 % de sulfato amónico al tampón de trabajo.

V.2.3.3.1.2 Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Se añadieron concentraciones crecientes de sulfato amónico para precipitar las proteínas de forma fraccionada. Se tomaron 10 ml de solución enzimática con 1 mg/ml de proteína en tampón fosfato de sodio 30 mM, pH 7. En la **Tabla 34** se observan las cantidades de sulfato amónico necesarias para conseguir cada porcentaje de saturación. En el primer paso (20 %), este fue añadido lentamente a la solución enzimática, en condiciones de agitación leve y a 4 °C. Una vez disuelto

completamente se dejaron transcurrir 30 min y se centrifugó a 15.000 r.p.m a 4 °C durante 30 min en una centrífuga RC6 Plus de Sorvall, con rotor F14S-6x250. El precipitado se resuspendió en tampón fosfato de sodio 30 mM, pH 7 y conservado 4 °C. En el sobrenadante se continuó añadiendo sulfato amónico para alcanzar el siguiente punto de saturación.

Tabla 34. Cantidad de sulfato amónico que debe ser añadido para alcanzar los distintos porcentajes. Los gramos indicados deben ser añadidos al porcentaje inmediatamente anterior.

Sulfato de amonio									
Porcentaje de saturación	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Gramos a añadir a 1l de solución	106	55	56	58	60	62	65	67	70

Posteriormente, todas las fracciones fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. en tubos vivaspin de Sartorius con un tamaño de poro de 30 kDa en una centrífuga Universal 320R, de Hettich, con rotor 1620A-6x130g, y lavadas con tampón fosfato 30 mM, pH 7 para retirar los restos de sulfato amónico. Se midió su actividad por triplicado en lector de placas multipocillo Expert Plus de Asys a 405 nm.

V.2.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico

Esta técnica se utilizó como segundo paso para la purificación de la enzima β -fucosidasa de *C. gélida*, después de la precipitación fraccionada en sulfato amónico.

V.2.3.3.2.1 Estudio del efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática

Puesto que una vez unidas las proteínas a la resina de purificación, estas son eluidas con concentraciones crecientes de cloruro sódico, lo primero que se realizó fue un estudio sobre la actividad de la β -fucosidasa en presencia de esta sal. Para ello se llevó a cabo la reacción tal y como se explica en el apartado V.2.4.1.2, habiendo añadido previamente una concentración de 1M de cloruro sódico al tampón de trabajo.

V.2.3.3.2.2 Selección del tipo de resina de intercambio iónico

Se utilizaron cuatro tipos de resinas: Q-sefarosa, DEAE-sefarosa, S-sefarosa y CM-sefarosa. Se preparó una solución enzimática en tampón fosfato 30 mM pH 7 con la cantidad suficiente de polvo liofilizado para conseguir una concentración de proteínas de 1 mg/ml. En un eppendorf de 2 ml se añadieron 1400 µl de esta solución enzimática y 600 µl de cada resina, equilibrada en tampón fosfato de sodio 30 mM, pH 7, el cual fue sometido a agitación leve durante 60 min a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 segundos a 4 °C (Centrífuga Mikro 120, Hettich). La resina fue lavada dos veces con tampón, centrifugando como anteriormente y conservando los sobrenadantes de los dos lavados (lavado 1 y lavado 2). A la resina se le añadieron 1400 µl de tampón de elución (tampón fosfato 30 mM, pH 7 con cloruro sódico 1M) y se sometió a agitación leve durante 30 min a 4°C. Se centrifugó y se conservó el sobrenadante (eluido 1). Se repitió el proceso de elución (eluido 2). Se midió la actividad en todas las muestras anteriores, junto con una pequeña cantidad de la propia resina.

V.2.3.3.2.3 Elución con concentraciones crecientes de cloruro sódico

Se siguió el protocolo del apartado V.2.3.3.2.2 con DEAE-sefarosa y Q-sefarosa hasta el paso de la elución, en el que se aplicaron tampones de elución con concentraciones crecientes de cloruro sódico: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 M. Se midió la actividad en cada eluido. Posteriormente se realizó con las siguientes concentraciones de cloruro sódico: 0,2 0,25, 0,3, 0,35 y 0,4 M

V.2.3.3.3. Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-150

Esta técnica se utilizó como tercer paso para la purificación de la enzima β-fucosidasa de *C. gélida*, después de la cromatografía de intercambio iónico. Se utilizó resina Sephadex G-150 superfino. Este gel fue previamente hidratado con agua miliQ y equilibrado con tampón fosfato 30mM, pH 7 siguiendo las

instrucciones del fabricante. Posteriormente se empaquetó un volumen de 50 ml en una columna cromatográfica de 75 x 1,8 cm y se eluyó con dos volúmenes de tampón. El flujo de elución fue de 0,3 ml/min. Se cargó en la columna un volumen de 3 ml de la muestra proveniente de la cromatografía de intercambio iónico (apartado anterior). Se recogieron fracciones de 2 ml en las que se midió su absorbancia a 280 nm y su actividad β -fucosidasa (apartado V.2.4.1.2).

V.2.3.3.4. Detección de la banda correspondiente a la β -fucosidasa de *C. gelida* en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Se llevó a cabo una electroforesis en condiciones nativas (apartado V.2.3.2.2) con 10 μ l de la muestra purificada en el apartado anterior, con una concentración de 1 mg/ml. Una vez finalizada, se cortó el carril del gel y se incubó en 5 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM con una concentración 10 mM del sustrato Fuc- β -MU, a 30 °C durante 30 min en agitación leve. Pasado el tiempo, el gel se reveló bajo luz UV.

V.2.3.4. Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad

Las enzimas recombinantes con colas de histidina expresadas en *E. coli* se purificaron por medio de cromatografía de afinidad Ni(II)–agarosa. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente en el dispositivo para purificación de proteínas (Biologic LP, BioRad) sobre una serie de columnas de afinidad IMAC (del inglés “*immobilized metal affinity chromatography*”), cargadas con iones de Ni(II), se utilizaron los siguientes tampones (por orden de elución) como fase móvil:

- Tampón de adhesión: 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 1 mM de imidazol.
- Tampón de lavado de 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 10 mM de imidazol.

- Tampón de elución 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 500 mM de imidazol.

La purificación se llevó a cabo por métodos convencionales detectando la presencia de proteínas con luz UV (280nm)

Se centrifugaron los cultivos de bacterias a 6500 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7. Las células fueron resuspendidas y se rompieron por sonicación con las condiciones descritas en el apartado V.2.1.6. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15.000 r.p.m. por 30 min a 4 °C.

Se eliminó el sólido generado y se calentó el líquido durante 30 min a 70 °C para eliminar por precipitación térmica proteínas de *E. coli* desnaturalizadas. Después se eliminó el precipitado por centrifugación durante 30 min a 4 °C y 15.000 r.p.m.. El extracto celular generado, conocido como “extracto clarificado” se hizo pasar por columnas cargadas de Ni(II) en un aparato de purificación de proteínas Biologic LP (BioRad) siguiendo el protocolo dado por el fabricante.

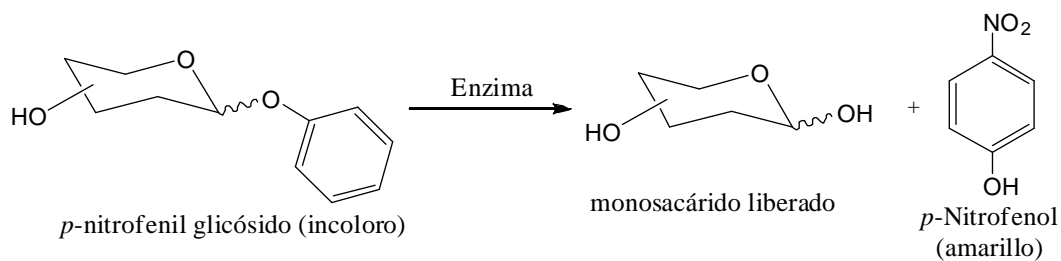
Se eluyeron como máximo, el equivalente a 500 ml de cultivo bacteriano en forma de extracto celular sobre 3 columnas de 1 ml, disuelto en tampón fosfato de sodio 50 mM, 300 mM de NaCl y pH 8,00. La elución dio inicio después de equilibrar la columna con tampón de adhesión. Se cargó la muestra de extracto celular a un flujo de 0,5 mL/min. Una vez finalizado el proceso de carga de la muestra, se realizó la elución con tampón de lavado, que debido a su concentración de imidazol (10 mM) facilitó la eliminación de otras proteínas que pudieran tener cierta afinidad por el Ni(II). Finalmente se lavó la columna con tampón de elución obteniéndose una serie de fracciones enriquecidas en proteínas recombinantes con cola de histidinas. Las fracciones con la enzima recombinante (His₆tag) se desalinizaron y se concentraron con un tubo de ultra centrifugación Amicon (Millipore) a 4.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C, repitiendo la desalinización tres veces con tampón fosfato de sodio 50

mM, pH 7,00. Posteriormente, se determinó la actividad relativa de cada proteína purificada y se analizó su pureza por electroforesis SDS-PAGE.

V.2.4. Ensayos enzimáticos

V.2.4.1. Determinación de la actividad enzimática de glicosidasas

Para determinar la actividad hidrolítica de las diferentes glicosidasas utilizadas en esta memoria se usaron azúcares activados en la posición anomérica por una molécula de *p*NF (Esquema 31). Este *p*NF se cuantificó espectrofotométricamente a 405 nm para determinar la cantidad equivalente de azúcar liberado. Finalmente la actividad enzimática específica se determinó en función de los micromoles de *p*NF liberados por minuto y por un miligramo de proteína.



Esquema 31. Representación de la hidrólisis de p-nitrofenil glicósidos para su cuantificación enzimática.

La actividad enzimática se determinó a diferentes valores de pH, según los requerimientos de la enzima y a un valor de absorbancia de 405 nm (máximo de absorbancia del *p*NF). Se definió una unidad internacional enzimática (UI) como los micromoles de *p*NF liberados por minuto en las condiciones de un determinado ensayo. Se define la unidad de actividad específica cuando se refiere a la cantidad de enzima en miligramos (UI/mg)

Para cuantificar el *p*NF liberado se pesaron 25 mg de sólido (*p*NF comercial calidad HPLC. Sigma-Aldrich) y se disolvieron en un matraz aforado de 100 ml con agua

destilada. De este primer patrón (1,98 mM) en agua destilada se tomaron 1,6 ml y se le adicionaron 3,48 ml del tampón de interés, para ajustar el pH en las mismas condiciones de la matriz de trabajo.

De éste segundo patrón (566 μ M) se tomaron alícuotas de 20 μ L cada una (**Tabla 35**) y se añadieron a una cubeta de cuarzo con 2,5 ml de carbonato de sodio 0,20 M (o tampón ajustado al valor de pH deseado en la recta calibrado) y se leyó la absorbancia a 405 nm. Con los datos obtenidos de la **Tabla 35** se elaboró un gráfico de absorbancia leída a 405 nm en función de la concentración milimolar de *p*NF. Cada uno de los puntos se repitió por triplicado.

Tabla 35. Disoluciones sucesivas de un patrón de *p*NF (0,566 mM) para realizar la recta de calibrado a 405 nm.

Nº	Volumen añadido de <i>p</i> NF (0,566 mM)	Concentración en cubeta <i>p</i> NF (mM)
0	0	0,0000
1	20	0,0045
2	40	0,0089
3	60	0,0133
4	80	0,0176
5	100	0,0218
6	120	0,0259
7	140	0,0300
8	160	0,0341
9	180	0,0380
10	200	0,0419
11	220	0,0458
12	240	0,0496
13	260	0,0533
14	280	0,0570
15	300	0,0606

V.2.4.1.1. Selección de microorganismos productores de glicosidasas

Se crecieron los microorganismos como se indica en el apartado V.2.1.3, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. Los caldos de cultivo, una vez crecidos los microorganismos, fueron traspasados a tubos falcon y centrifugados a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga RC6 Plus de Sorvall, con rotor F14S-6x250. El sobrenadante se conservó para comprobar la presencia de enzimas extracelulares. Las células precipitadas fueron lavadas con tampón fosfato 30 mM, pH 7 y de nuevo centrifugadas, para eliminar el medio de cultivo que pudiera quedar. Posteriormente fueron resuspendidas en 5 ml en ese mismo tampón.

Las reacciones de hidrólisis de glicósidos se llevaron a cabo en tubos Eppendorf, en los que se introdujeron 450 µl de cada microorganismo y 50 µl de cada sustrato en una concentración 5 mM, para obtener una concentración final de 0,5 mM. Los sustratos utilizados fueron *pNF-α-Fuc*, *pNF-β-Fuc*, *pNF-α-Gal*, *pNF-β-Gal*, *pNF-α-Glu*, *pNF-β-Glu*, *pNF-α-Man*, *pNF-β-D-Man*, *pNF-β-GalNAc* y *pNF-β-GlcNAc*. Los tubos se mantuvieron en agitación durante 10 min a 30 °C en caso de los microorganismos de la colección BTG, a 37 °C y a 65 °C en caso de *T. Thermophilus* PRQ25.

Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga de sobremesa (Mikro 120. Hettich). Se tomaron 200 µl del sobrenadante y se introdujeron en un pocillo de una placa multipocillo. Se midió su absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm, utilizando como blanco tampón fosfato de sodio 30 mM, pH 7 con el sustrato correspondiente en una concentración de 0,5 mM.

Para considerar los resultados positivos o negativos se aplicaron los siguientes criterios:

-Absorbancia entre 0 y 0,05 se consideró resultado negativo (-).

- Absorbancia entre 0,05 y 0,5 se consideró resultado positivo (+).
- Absorbancia mayor de 0,5 se consideró resultado doble positivo (++)

Los resultados positivos se repitieron tres veces para confirmar que se mantuvieran constantes y fueran reproducibles. Cada repetición corresponde a un crecimiento independiente de los microorganismos y su respectiva reacción con los sustratos.

V.2.4.1.2. Cuantificación de la actividad de enzimas glicosidasa

Fourage y col (1999), han explicado dos formas analíticas para cuantificar el *p*NF liberado en reacciones de hidrólisis enzimática donde se utilizan éstos glicósidos que liberan *p*NF. La primera forma es llamada el método continuo, y consiste en determinar el aumento de la absorbancia a 405 nm por liberación de *p*NF. En este método, la temperatura y el pH se deben controlar con precisión para reproducir con exactitud la recta de calibrado. La segunda forma de determinar la actividad se le conoce como método discontinuo, y consiste en detener la reacción en un momento determinado (por lo general adicionando NaOH ó Na₂CO₃ concentrados), cuantificando el *p*NF liberado en las mismas condiciones de fin de la reacción. El uso de NaOH ó de Na₂CO₃ garantiza alcanzar valores de pH tan altos que el equilibrio de ionización del *p*NF está completamente desplazado hacia la forma disociada (Fourage y col. 1999). Es importante mencionar que ambas metodologías (continua y discontinua) han sido utilizadas en varios estudios, resaltando entre éstos el clonaje y purificación de enzimas termófilas (Dion y col. 1999) y la purificación de tres enzimas β -galactosidasas de *B. circullans* ATCC 31382 (Vetere y col. 1998), por lo que su validez ha sido comprobada.

V.2.4.1.2.1 Ensayo de actividad enzimática por liberación de *p*NF: método continuo

En una cubeta de cuarzo se adicionaron 2 ml de *p*NF-glicopiranósido (5 mM) disuelto en tampón de trabajo a pH 7. Los sustratos utilizados fueron *p*NF- α -Fuc,

*p*NF- β -Fuc, *p*NF- α -Gal, *p*NF- β -Gal, *p*NF- α -Glu, *p*NF- β -Glu, *p*NF- α -Man, *p*NF- β -D-Man, *p*NF- β -GalNAc y *p*NF- β -GlcNAc. La mezcla se atemperó en el espectrofotómetro mediante un baño de agua circulante adaptado al sistema y se agitó con un agitador magnético adaptado al espectrofotómetro. La temperatura de este ensayo fue de 30 °C para las enzimas mesófilas, 37 °C para enzimas de *B. circulans* y 65 °C para enzimas termófilas. Una vez que la cubeta se hubo atemperado por al menos 90 segundos, se adicionaron 10 μ L de enzima (normalmente con una concentración de 1 mg/mL, para que la cantidad total de proteína sea de 1 μ g). Al añadir la enzima se cuantificó el incremento de absorbancia a 405 nm y se midieron los resultados frente a una recta de calibrado de *p*NF realizada en las mismas condiciones experimentales: pH 7, tampón fosfato de sodio 50 mM.

V.2.4.1.2.2 Ensayo de actividad enzimática por liberación de *p*NF: método discontinuo

En un tubo Eppendorf se adicionaron 4 μ L de disolución *p*NF-glicopiranósido 50 mM, a este se le añadió el tampón de trabajo en cantidad apropiada para que la suma de volúmenes incluyendo la enzima (por lo general con un volumen no mayor a 10 μ L y de concentración exactamente conocida) fuese de 200 μ L. Los sustratos utilizados fueron *p*NF- α -Fuc, *p*NF- β -Fuc, *p*NF- α -Gal, *p*NF- β -Gal, *p*NF- α -Glu, *p*NF- β -Glu, *p*NF- α -Man, *p*NF- β -D-Man, *p*NF- β -GalNAc y *p*NF- β -GlcNAc. Se agitó la mezcla en un vortex y se calentó a la temperatura adecuada del ensayo (30 °C para la colección BTG, 37 °C para *B. circulans* y 65 °C para termófilos). Pasados 10 min, la reacción se detuvo por adición de 800 μ l de Na₂CO₃ 0,20 M y se enfriaron las muestras hasta su lectura en el espectrofotómetro. Se realizó un blanco de procedimiento, al cual no se le adicionó ninguna cantidad de enzima hasta después de agregar el Na₂CO₃.

V.2.4.1.3. Cálculo de pH óptimo de actividad enzimática de β -Gal-3

La enzima β -Gal-3 se diluyó hasta obtener lecturas espectrofotométricas de hidrólisis de p NF- β -Gal entre 0,1 y 0,9 a 405 nm, utilizando el método discontinuo descrito en el apartado V.2.4.1.2. La hidrólisis se realizó a 37 °C utilizando p NF- β -Gal como sustrato. Las mediciones enzimáticas se realizaron en presencia de tampones citrato/fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH desde 4 hasta 5,5 y fosfato de sodio 50 mM desde pH 5,5 hasta 9.

Los valores de pH de cada disolución se midieron a 37 °C. En todos los casos el volumen del tampón superó al de la muestra en casi 20 veces, para garantizar un ajuste aproximado del pH al del tampón utilizado. La actividad enzimática obtenida para cada valor de pH se expresó como actividad relativa respecto al valor máximo hallado, y el error promedio del experimento (expresado como desviación estándar) no superó el 5%.

V.2.4.1.4. Termoestabilidad de β -Gal-3

Para estudiar la termoestabilidad de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans*, se prepararon alícuotas de la enzima de 200 μ l con una concentración de 1 mg/ml y se incubaron a diferentes temperaturas: 30, 40, 50 60. Cada 2 h y hasta las 24 h se midió la actividad hidrolítica de cada una de ellas según el método continuo descrito en el apartado V.2.4.1.2.1.

V.2.4.1.5. Temperatura óptima de reacción de β -Gal-3

Se midió la actividad hidrolítica de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* según el método continuo descrito en el apartado V.2.4.1.2.1 variando la temperatura a la que se realiza la reacción: 30, 37, 45, 50, 55 y 60 °C.

V.2.4.1.6. Localización de actividad enzimática en bandas de gel de electroforesis

El reactivo 4-metil-umberiferil- β -D-fucopiranosido fue utilizado para revelar geles de acrilamida en condiciones nativas y localizar la banda en la que se encuentra la enzima β -fucosidasa. Para ello se cortó el carril del gel y se incubó en una solución de sustrato en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 durante 30 min. Transcurrido este tiempo se reveló bajo luz UV.

V.2.4.2. Reacciones de transglicosidación

V.2.4.2.1. Reacciones de transglicosidación con células enteras

Se crecieron los microorganismos como se indica en el apartado V.2.1.3, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. Los caldos de cultivo, una vez crecidos los microorganismos, fueron traspasados a tubos Falcon y centrifugados a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga RC6 Plus (rotor F14S-6x250. Sorvall). El sobrenadante se conservó para comprobar la presencia de enzimas extracelulares. Las células precipitadas fueron lavadas con tampón fosfato 30 mM, pH 7 y de nuevo centrifugadas para eliminar el medio de cultivo que pudiera quedar. Posteriormente fueron resuspendidas en 5 ml ese mismo tampón.

Las reacciones se efectuaron con una concentración 85 mM de donador y 425 mM de aceptor (relación 1:5), para un volumen de reacción final de 1 ml en tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7. Los sustratos utilizados como donadores fueron: *p*NF- α -Fuc, *p*NF- β -Fuc, *p*NF- α -Gal, *p*NF- β -Gal, *p*NF- α -Glu, *p*NF- β -Glu, *p*NF- α -Man, *p*NF- β -D-Man, *p*NF- β -GalNAc y *p*NF- β -GlcNAc, y como aceptores: Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C en caso de los microorganismos de la colección BTG y a 70 °C en caso de *T. thermophilus* PRQ25, y se iniciaron añadiendo 500 μ l de células resuspendidas. De cada reacción se tomaron alícuotas de 50 μ L cada 1, 3, 8 y 24 h. Cada alícuota se centrifugó a 14.000 r.p.m durante 5 min para separar las células y finalizar la reacción. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1).

V.2.4.2.2. Reacciones de transglicosidación con enzimas glicosidasa

Las reacciones se efectuaron con una concentración 85 mM de *pNF-β-Fuc* como donador y 425 mM de aceptor (relación 1:5) para un volumen de reacción final de 1 ml. Los sustratos utilizados como donadores fueron: *pNF-α-Fuc*, *pNF-β-Fuc*, *pNF-α-Gal*, *pNF-β-Gal*, *pNF-α-Glu*, *pNF-β-Glu*, *pNF-α-Man*, *pNF-β-D-Man*, *pNF-β-GalNAc* y *pNF-β-GlcNAc*, y como aceptores: Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc. Las reacciones se realizaron en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 con agitación magnética. Cada reacción se inició añadiendo 10 UI de enzima. De cada reacción se tomaron alícuotas de 20 μL cada 1, 3, 8 y 24 h. Cada alícuota se calentó a 80 °C para finalizar la reacción y se diluyó 10 veces con agua en el caso de mesófilos, o se diluyó 10 veces con metanol en caso de termófilos. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1).

Las reacciones con β-fucosidasa de *C. gélida* se llevaron a cabo a 30 °C usando como donador *pNF-β-Fuc*. Las reacciones con α-glucosidasa de *T. thermophilus* se realizaron a 70 °C usando como donador *pNF-α-Glu*. Las reacciones con β-Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 se llevaron a cabo utilizando como donador *pNF-β-Gal*.

V.2.4.2.3. Reacciones de transglicosidación en presencia de disolventes sostenibles

En las reacciones para medir el efecto de los diferentes disolventes sostenibles sobre la actividad enzimática, se realizaron tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2, añadiendo los derivados de biomasa (

Esquema 15 del apartado III.2.3.1) en una concentración final 2M o los LI (**Esquema 16** del apartado III.2.3.2) en una concentración final del 30%.

En las reacciones para medir el efecto de diferentes concentraciones del derivado de biomasa S13 sobre la actividad enzimática, se añadió al medio de reacción en cantidad suficiente para obtener concentraciones finales de 1, 2 y 3 M

En las reacciones para medir el efecto de diferentes concentraciones del LI [Bmim][PF₆] sobre la actividad enzimática, se añadió al medio de reacción en cantidad suficiente para obtener concentraciones finales de 1, 2 y 3 M

V.2.4.2.4. Reaccion de transglicosidación con enzimas glicosintasa

V.2.4.2.4.1 Reacciones con las enzimas β -Gal-3 E157G y β -Gal-3 E233G de *B. circulans*

Las reacciones se efectuaron con Gal- α -F 85 mM como donador y diferentes concentraciones de aceptor, en relación 1:1, 1:3 y 1:5, para lo que se utilizaron GlcNAc, GalNAc y *p*NF-GlcNAc. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 500 μ l en tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM para las reacciones a pH 4 y tampón fosfato de sodio 50 mM para las reacciones a pH 6. Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C con 50 μ g de enzima. Se tomaron alícuotas de 20 μ l a distintos tiempos (1, 8 y 24 h). Cada alícuota se calentó a 80 °C para finalizar la reacción y fueron diluidas 10 veces con agua. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1).

V.2.4.2.4.2 Reacciones con la enzima TmGalA D327G-HisTag de *T. maritima*

Las reacciones se efectuaron con una concentración 14 mM de Gal- β -N₃ como donador y 14 mM de diferentes aceptores: Glu, Man, Gal, Fuc, Fru, GalNAc, GlucNAc, *p*NF- α -Fuc, *p*NF- β -Fuc, *p*NF- α -Gal, *p*NF- β -Gal, *p*NF- α -Glu, *p*NF- β -Glu, *p*NF- α -Man, *p*NF- β -D-Man, *p*NF- β -GalNAc y *p*NF- β -GlcNAc (relación 1:1), para un volumen de reacción final de 100 μ l en tampón acetato de sodio 50 mM y pH 5. Las reacciones se llevaron a cabo a 65 °C durante 16 h. Cada reacción se inició añadiendo 10 μ g de enzima. De cada reacción se tomaron alícuotas de 20 μ L y se diluyeron 10 veces en metanol para finalizar la reacción. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1).

En las reacciones para medir el efecto de los diferentes disolventes sostenibles usados en esta memoria sobre la actividad enzimática, se añadieron los derivados de biomasa (

Esquema 15 del apartado III.2.3.1) en una concentración final 2M y los LI (**Esquema 16** del apartado III.2.3.2) en una concentración final del 30%.

V.2.4.3. Reacciones con glicosiltransferasas

V.2.4.3.1. Reacciones con glicosiltransferasas de *T. thermophilus* PRQ25

Las reacciones se efectuaron con una concentración 20 mM de GDP-Man o UDP-Glu como donador, y 40 mM de Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc o GlcNAc como aceptores, en tampón Tris/HCl 10 mM con MgCl₂ 5 mM pH 7 en un volumen de 500 µl a una temperatura de 70 °C. Las reacciones se iniciaron añadiendo 50 µg de enzima al medio de reacción. De cada reacción se tomaron alícuotas de 20 µL cada 1, 3, 8 y 24 h. Cada alícuota se diluyó 10 veces en metanol en el caso de las enzimas termófilas para finalizar la reacción. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado V.2.7.1).

V.2.4.3.2. Reacciones con sialiltransferasas en la síntesis de glicodendrimeros funcionalizados con ácidos siálicos

V.2.4.3.2.1 Síntesis de quimio-enzimática de neu5gc

V.2.4.3.2.1.1 Paso 1: Síntesis química de N-glicolil-D-manosamina

La reacción se llevó a cabo en un matraz de dos bocas en 40 ml de N,N-dimetilformamida anhidra (DMF) en atmosfera inerte de argón, con agitación magnética y temperatura ambiente. Se añadieron 1,5 ml de trietilamina y 2 g de hidroc loruro de D-manosamina (9,3 mmoles, 1 equivalente) y se dejó solubilizar durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron 848,7 mg de ácido glicólico (1,2 equivalentes). A continuación, en oscuridad, se añadieron 1,4 g (10,2 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Se introdujo la mezcla de reacción en un

baño de hielo y, tras dejarlo enfriar, se añadieron 1,7 ml (11,1 mmol) de N,N'-Diisopropil carbodiimida (DIC). La reacción transcurrió durante 16 h y su seguimiento se llevó a cabo por TLC, usando como fase móvil una solución de cloroformo/metanol en relación 2:1. Finalizada la reacción el crudo se filtró a vacío. Posteriormente se concentró y purificó en una columna de sílica gel (apartado V.2.5.5) con la misma fase móvil utilizada anteriormente en la TLC, y el producto se caracterizó por RMN (apartado V.2.7.2).

V.2.4.3.2.1.2 Paso 2: Síntesis enzimática de Neu5Gc (Reacción con aldolasa)

La reacción se llevó a cabo en 10 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,6 al que se añadieron 728 mg del manNgc obtenido en el apartado anterior (1 equivalente) y 1,021 g de piruvato de sodio (3 equivalentes). Al medio de reacción se añadió azida sódica hasta una concentración final de 0,025 M y 10 mg de aldolasa comercial (*N*-acetyl neuraminic acid aldolase. Sorachim). La reacción tuvo lugar a 37 °C con agitación orbital. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC (fase móvil butanol/acetona/etanol/agua en relación 35/35/7/23), la cual finalizó a las 18h. Fue detenida añadiendo 50 ml de etanol y manteniendo en baño de hielo durante 2 horas.

Pasado ese tiempo el medio de reacción se centrifugó en una a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante fue concentrado a vacío y purificado en una columna Bio Gel P-2 de Biorad, utilizando agua destilada como fase móvil (apartado V.2.5.6). El proceso de purificación se repitió en las mismas condiciones. El compuesto final fue concentrado a vacío, liofilizado y analizado por RMN (apartado V.2.7.2).

V.2.4.3.2.2 Activación enzimática de ácidos sialicos con citidin trifosfato (CTP)

La reacción se llevó a cabo en 16 ml de tampón Tris/HCl 50 mM con MgCl₂ 50 mM pH 8,6 al que se añadieron 504,2 mg de ácido siálico (1 equivalente) y 945,2 mg de citidina trifosfato (CTP) (1,2 equivalentes). El medio de reacción se incubó en baño a 37 °C con agitación magnética en un aparato tritador Metrohm 665 Dosimat, programado para mantener el pH a 8,6 con NaOH 2M. Una vez alcanzada la

temperatura y el pH, se añadieron 60 mg de enzima CSS y 40 μ l de pirofosfatasa inorgánica comercial. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC (fase móvil *N*-propanol/H₂O/NH₃ 8:2:1 respectivamente), la cual finalizó a las 24h. El medio de reacción se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos. El sobrenadante fue liofilizado (apartado V.2.5.7) y conservado a -20 °C para su posterior utilización.

V.2.4.3.2.3 Reacción de sialiltransferasas α 2,6SiaT y α 2,3SiaT de *Photobacterium sp.*

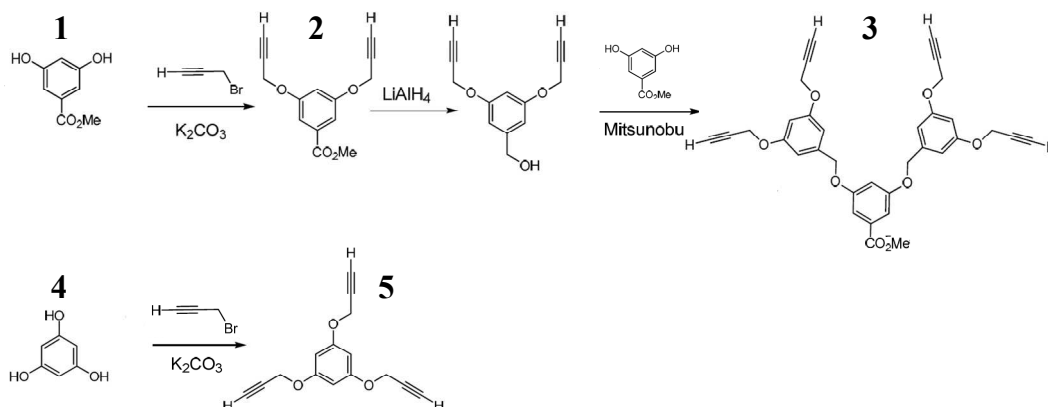
La reacción se llevó a cabo en 1,5 ml de tampón Tris/HCl 50 mM con MgCl₂ 50 mM pH 8,6 al que se añadieron 30 mg (1 equivalente) de glicodendrím ero aceptor (descritos en el apartado V.2.4.3.2.4) y 5 equivalentes de donador (CMP-siálico) por cada brazo de glicodendrím ero. Tras reajustar el pH a 8,6 se incubó durante 5 minutos a 30 °C. Se añadieron 60 μ l de sialiltransferasa α 2,6SiaT o α 2,3SiaT de *Photobacterium sp* (concentración 1 mg/ml) y 20 μ l de fosfatasa alcalina comercial. El pH fue comprobado regularmente y ajustado a 8,6 con NaOH 2M. El seguimiento de la reacción se realizó por HPLC (apartado V.2.7.1.2). Finalizada la reacción a las 18 h, el medio de reacción fue centrifugado a 14.000 r.p.m durante 1 min y purificado en una columna Bio Gel P-2 de Biorad, utilizando agua destilada como fase móvil (apartado V.2.5.6). Los tubos que contenían el compuesto fueron reunidos y concentrados a vacío. El compuesto final fue concentrado a vacío, liofilizado y analizado por RMN (apartado V.2.7.2).

V.2.4.3.2.4 Síntesis de glicodendrím eros aceptores para las reacciones con sialiltransferasas

Se utilizaron diferentes glicodendrím eros que fueron sintetizados y caracterizados en nuestro drupo de investigación por el Doctorando Mario Kaspar-Deir como parte de su Tesis Doctora (en realización)l. La síntesis de estos compuestos se describe brevemente a continuación:

V.2.4.3.2.4.1 Dendrímeros hidrofílicos (tipo G1)

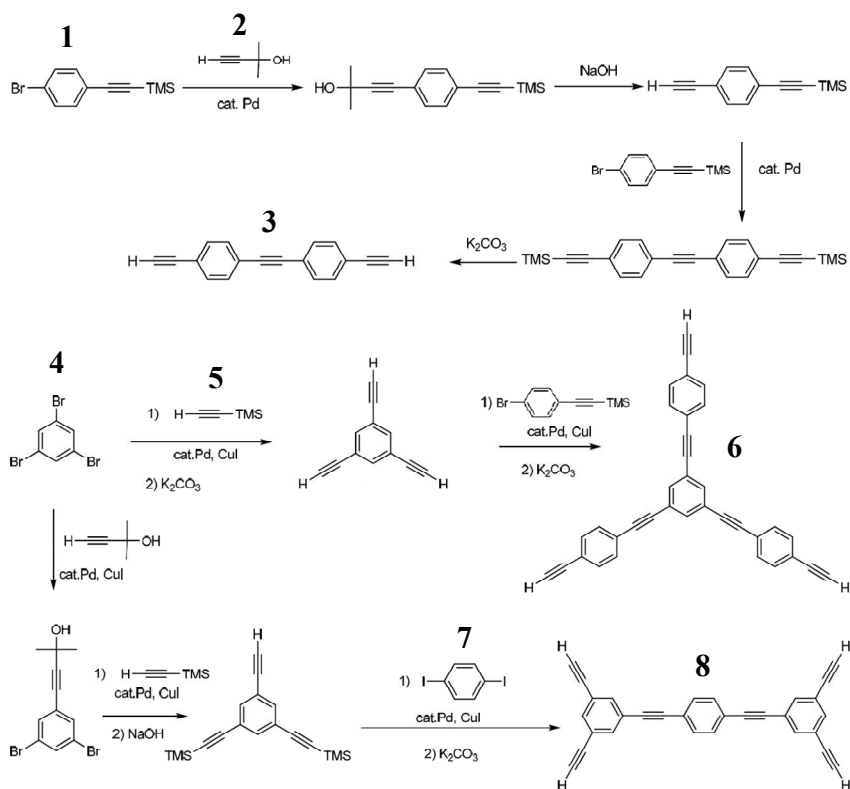
Con el fin de aumentar la hidrofiliidad del dendrímero, se utilizaron restos de hidroxibencenos como esqueleto del mismo, y como fuente del resto etínico se empleó bromuro de propargilo en carbonato potásico. En este caso, la reacción elegida para la construcción de las diferentes multivalencias del dendrímero es la reacción de Mitsunobu (Mitsunobu 1981; Charette y *col.* 2001); en este sentido, para obtener los compuestos con multivalencia de 2 y 4 restos acetilénicos (compuestos 2 y 3, Esquema 32) se utiliza el 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (compuesto 1) como producto de partida, mientras que para la síntesis del dendrímero con 3 restos acetilénicos (Compuesto 5), se ha partido del floroglucinol (compuesto 4, Esquema 32). Todos los dendrones y dendrimeros preparados tienen un resto de acetileno terminal, ya que el anclaje posterior del glicoconjugado se llevó a cabo mediante química “click” (cicloadición 1,3-dipolar entre el resto azida del glicoconjugado y un acetileno terminal). Estos dendrímeros fueron los precursores de los glicodendrímeros G1.2, G1.3 y G1.4.



Esquema 32. Síntesis de dendrímeros de tipo G1. Compuestos 1 y 4: compuestos de partida 3,5-dihidroxibenzoato de metilo y floroglucinol respectivamente, 2) precursor de G1.2, 3) precursor de G1.3 y 4) precursor de G1.4

V.2.4.3.2.4.2 Dendrimeros con grupos cromóforos (tipo G2)

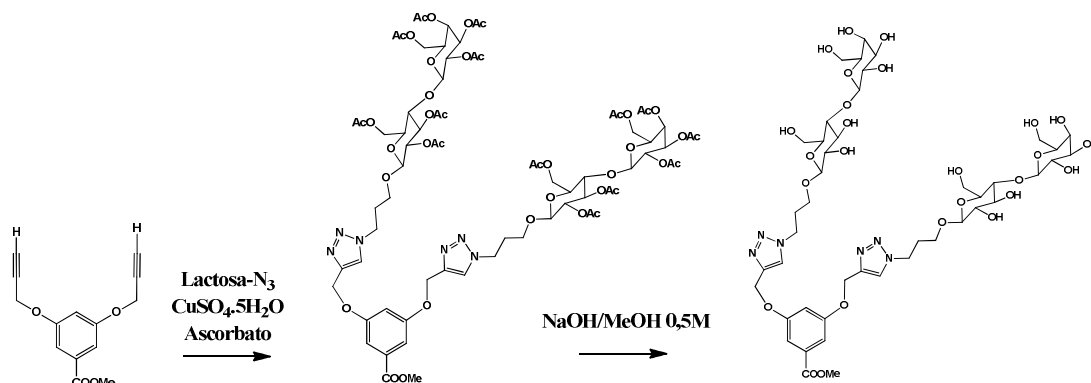
Se utilizaron como grupos cromóforos derivados de feniletinilo, que presentan alta fluorescencia. La síntesis se basó principalmente en la reacción de Sonogashira (1991) catalizada con $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$; para ello, se partió de diferentes derivados de bromobenceno e iodobenceno (compuestos 1, 4 y 7 del **Esquema 33**), empleando como fuente del triple enlace el dimetiletinilcarbinol y trimetilsililacetileno (TMS) (compuestos 2 y 5 del **Esquema 33**). El diferente grado de multivalencia de los dendrones y dendrimeros se obtuvo utilizando adecuadamente los métodos de desprotección selectiva con NaOH seca/tolueno y $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{THF}$ de los restos carbinol y TMS (Takahashi y col. 1980; Ames y col. 1981; Dabdoub y col. 2001), y sucesivas reacciones de Sonogashira con los derivados halogenados adecuados. Estos dendrimeros fueron los precursores de los glicodendrimeros G2.2, G2.3 y G2.4.



Esquema 33. Síntesis de dendrimeros de tipo G2. Compuestos 1, 4 y 7: derivados de bromobenceno e iodobenceno de partida, 2 y 5) fuente del triple enlace: dimetiletinilcarbinol y TMS respectivamente. 3) precursor de G2.2, 6) precursor de G2.3 y 8) precursor de G2.4.

V.2.4.3.2.4.3 Preparación de glicodendrimeros

La formación de los glicodendrimeros se llevó a cabo mediante química “click” (Kolb y col. 2001; Rostovtsev y col. 2002; Tornøe y col. 2002) entre los dendrimeros sintetizados en el apartado anterior y glicoconjugados protegidos de forma acetilada (Lactosa- N_3), utilizando $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, ascorbato sódico y microondas. Finalmente, se llevó a cabo la desprotección de los restos acetilo con NaOH / MeOH, como se especifica en el **Esquema 34**.



Esquema 34. Ejemplo de proceso de funcionalización con lactosa- N_3 y desacetilación de un precursor de glicodendrimer: el G1.2, para la obtención del glicodendrimer final.

V.2.4.3.3. Uso de enzimas no glicosidasas para la modificación estructural de glicopéptidos

V.2.4.3.3.1 Reacción de desacilación con con lipasas y serín proteasas

La reacción se llevó a cabo en 1 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM con agitación magnética durante 96 h. Los glicopéptidos utilizados fueron teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 en concentración final de 2 mg/ml. Se disolvieron en el tampón y se atemperó la solución. Cada reacción comenzó añadiendo 50 UI de lipasa de *Candida rugosa*, *Pseudomonas stutzeri* o subtilisina de *Bacillus subtilis*. Las reacciones con lipasas se realizaron a pH 7,5 y 40 °C, y las reacciones con subtilisina a pH 7 y 45 °C. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo tomando una alícuota de 50 μ l cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las

96 h. Cada alícuota se calentó a 90 °C durante 5 min y se mezcló con 50 µl de acetonitrilo, para después ser filtrada. Las muestras fueron analizadas por HPLC según el protocolo del apartado V.2.7.1.3

V.2.4.3.3.2 Reaccion de oxidación con glucosa oxidasa

La reacción se llevó a cabo en 1 ml de tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7 con agitación magnética a 37 °C durante 96 h. Los glicopéptidos utilizados fueron teicoplanina, mideplanina y MDL 63,246 en concentración final de 2 mg/ml. Se disolvieron en el tampón y se atemperó la solución. Cada reacción comenzó añadiendo 10 UI de enzima glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* y 50 UI de catalasa comercial. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo tomando una alícuota de 50 µl cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Cada alícuota se calentó a 80 °C durante 5 min y se mezcló con 50 µl de acetonitrilo, para después ser filtrada en un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro. Las muestras fueron analizadas por HPLC según el protocolo del apartado V.2.7.1.3

V.2.4.3.3.3 Reacción de desglicosidación con *N*-acetil-hexosaminidasas y α -manosidasas

La reacción se llevó a cabo en 1 ml de tampón citrato 10 mM pH 5 con agitación magnética a 30 °C durante 96 h. Se usaron tres *N*-acetil-hexosaminidasas provenientes de diferentes orígenes: *Canavalia ensiformis*, *Aspergillus oryzae* y riñón bovino, con las que se utilizaron teicoplanina y mideplanina, y α -manosidasa de *Canavalia ensiformis*, con la que se utilizaron teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 en concentración final de 2 mg/ml. Se disolvieron en el tampón y se atemperó la solución. Cada reacción comenzó añadiendo 50 UI de enzima. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo tomando una alícuota de 50 µl cada 1, 5, 8 y después cada 24 h hasta las 96 h. Cada alícuota se calentó a 80 °C durante 5 min y se mezcló con 50 µl de acetonitrilo, para después

ser filtrada. Las muestras fueron analizadas por HPLC según el protocolo del apartado V.2.7.1.3

V.2.5. Purificación de compuestos

V.2.5.1. Extracción del derivado de biomasa S13

Terminada la reacción de transglicosidación en presencia de S13, la mezcla fue centrifugada a 14.000 r.p.m. durante 10 min y filtrada por un filtro de 0,2 µm. Posteriormente fue liofilizada para retirar el agua, quedando el S13 con los azúcares disueltos. Se añadió un volumen igual de hexano y tras disolver, la mezcla fue introducida en un baño de nitrógeno líquido (-196 °C). Esto provocó la precipitación de los azúcares, pero no la del S13, que permaneció disuelto en el hexano y pudo ser retirado por filtración a vacío, quedando la mezcla de azúcares separada del co-solvente. El hexano se separó del S13 en rotavapor y pudo ser completamente recuperado

V.2.5.2. Cromatografía en columna de carbono-celite

La purificación de disacáridos obtenidos en reacciones enzimáticas de transglicosidación se realizó por medio de columnas de 2 x 50 cm, con una altura de columna con aproximadamente 20 cm de fase estacionaria compuesta por un 50 % m/m de carbón activado y 50 % m/m de celite. Las columnas se lavaron como mínimo con 3 volúmenes de cada una de las fases móviles respecto al volumen de soporte. Las fases móviles usadas (por orden de elución) fueron:

- 100 % agua milliQ,
- 5 % de etanol absoluto en agua milliQ
- 10% de etanol absoluto en agua milliQ.
- 15 % de etanol absoluto en agua milliQ.

Los disacáridos se recogieron en las fracciones de la última elución, correspondiente al 15% de etanol (analizadas inicialmente por CCF). Posteriormente se analizó la pureza por HPLC (apartado V.2.7.1.1) y se determinó su estructura por RMN (apartado V.2.7.2).

V.2.5.3. Cromatografía de intercambio catiónico

Esta técnica se utilizó para la separación de la trietilamina en la síntesis quimioenzimática de Neu5Gc (apartado V.2.4.3.2.1). Se realizó en una columna de 18x1 cm con una altura de 6 cm de fase estacionaria compuesta por resina de intercambio catiónico Dowex AG 50WX8 100-200 mesh hydrogen form (Sigma). Se labó la resina con agua miliQ. Se realizaron cinco lavados con ácido clorhídrico 2N, tras lo que se midió el pH de lo eluido de la columna para asegurar que se encontraba entre 1 y 2. Se cargó la muestra diluida en agua y se eluyó utilizando agua miliQ como fase móvil. Se recogieron fracciones y se localizó el producto por TLC, utilizando la fase móvil descrita en cada punto del apartado V.2.4.3.2.1. Se ajustó el pH a 5 para evitar la descomposición del producto debido a la acidez del medio, se liofilizó y se conservó a -20 °C para su posterior utilización.

V.2.5.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

Fase estacionaria: cromatoplasas de sílice 60 F₂₅₄.

Las fases móviles se describen en cada caso.

Reveladores:

-Lámpara de ultravioleta/visible (UV/vis) de $\lambda = 254\text{nm}$.

-Revelador de azúcares: 10% de ácido sulfúrico en metanol.

V.2.5.5. Cromatografía en columna de sílica gel

La cromatografía en columna se llevó a cabo en columnas de vidrio de diferentes diámetros. Como fase estacionaria se empleó sílica gel 60, AC, C 40-63 μm . Se localizaron por TLC los tubos que contenían la muestra, los cuales fueron reunidos y concentrados por evaporación rotatoria.

V.2.5.6. Cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-2

La cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-2 se utilizó para la purificación de glicodendrimeros (apartado V.2.4.3.2.4). Se llevó a cabo en columnas de vidrio de 170 x 2 cm, usando como fase estacionaria resina BioGel P-2 Gel, fine, 45-90 μm , exclusion limits: 100-1800 (BioRad), y agua destilada como fase móvil. Se localizaron por TLC (fase móvil butanol/acetona/ácido acético/agua 32:33:7:28) las fracciones con la muestra fueron, que posteriormente fueron liofilizadas y analizadas por RMN (apartado V.2.7.2).

V.2.5.7. Liofilización

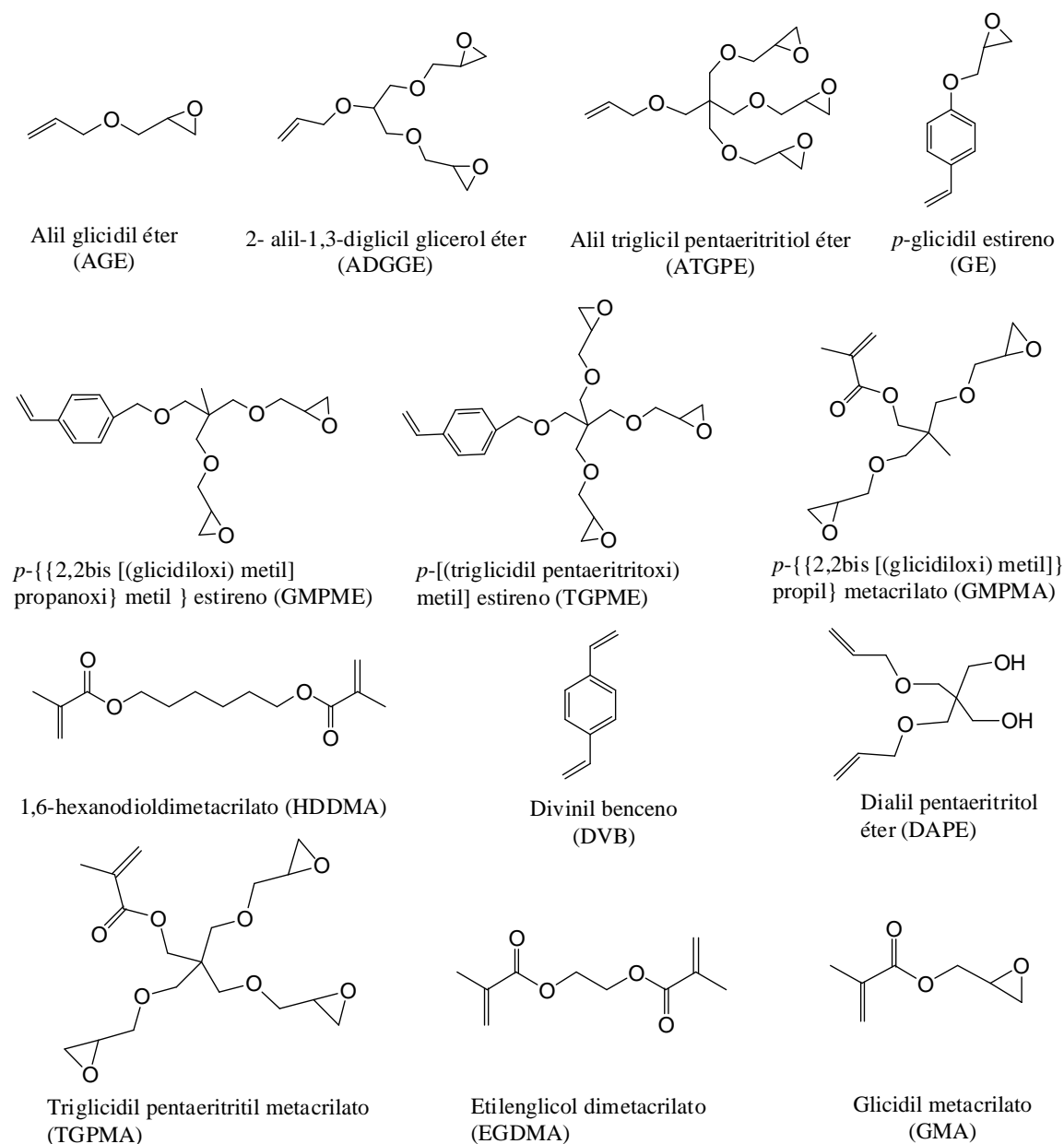
Los procesos de liofilización se efectuaron en un liofilizador Labconco, Lyph-Lock 12, (Hucha-Erlóss). Las muestras se congelaron introduciendo los viales en acetona con nieve carbónica de modo que tuvieran la mayor superficie posible. A continuación se conectaron al liofilizador hasta que se convirtieron en un polvo seco.

V.2.6. Inmovilización de la enzima B-Gal-3 de *B. circulans*

V.2.6.1. Inmovilización en polímeros macroporosos

Se utilizaron diferentes soportes macroporosos, sintetizados y caracterizados en nuestro drupo de investigación por el Dr. Antonio Aires como parte de su Tesis Doctoral.(

Esquema 35, Tabla 36) (Aires-Trapote 2012). Todos los soportes fueron funcionalizados con grupos epóxidos. En este trabajo, además, se ha utilizado un soporte comercial (Eupergit CM) que también está funcionalizado con grupos epóxidos, para comparar los resultados.



Esquema 35. Estructura de los monómeros utilizados en la síntesis de los polímeros funcionalizados con grupos epóxido.

Tabla 36. Composición de los polímeros macroporosos funcionalizados con grupos epóxido.

Soporte	Volumen de poro (ml)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m ² /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)
Enzima libre	-	-	-	-
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,6	20	333	0.9
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,2	25	33	1.6
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,2	23	39	4.0
Eupergit C	0,06	10	4.5	0,6

V.2.6.1.1. Proceso de Inmovilización en soportes macroporosos

Para la inmovilización de la enzima β -Gal-3 en soportes macroporosos, se utilizó 0,1 mg de proteína en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con 10 mg de soporte y 1,5 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 y 500 mM de NaCl. La mezcla se dejó en contacto a temperatura ambiente durante 24 h en agitador vertical a 25 r.p.m. Pasado

este tiempo, se cuantificó la cantidad de proteína en el líquido sobrenadante, y se determinó la cantidad de enzima unida covalentemente al soporte. El derivado obtenido se dejó en contacto con glicina 3M pH 8,5, durante 16 h en agitador vertical a 25 r.p.m. La mezcla final se filtró sobre un plato poroso y se lavó con tampón fostato de sodio 50 mM pH 6. El derivado inmovilizado se conservó a 4°C.

V.2.6.2. Inmovilización en soporte de glioxil agarosa

V.2.6.2.1. Estabilización de la enzima en medios alcalinos

Se incubaron 0,5 mg de enzima β -Gal-3 a 4°C en tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH 10 con un 20% de diferentes agentes estabilizantes: glicerol, trehalosa y PEG-600. Se tomaron alícuotas de 10 μ l a los 60 y 120 min para determinar la actividad de la enzima libre (apartado V.2.4.1.2)

Posteriormente se repitió el proceso anterior a 25 °C, utilizando diferentes concentraciones de PEG-600: 5, 10, 20, 30 y 50 %.

V.2.6.2.2. Proceso de inmovilización en soporte de glioxil agarosa

La inmovilización se realizó con 0,5 mg de enzima β -Gal-3, la cual se diluyó con tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,50 con un 50% de PEG-600 hasta un volumen final de 5 ml y el pH final de la disolución se ajustó hasta 10. Luego se añadió 1 g de soporte (agarosa entrecruzada al 10%). La mezcla se sometió a agitación orbital a 25 °C durante 30 min. De la mezcla se tomaron 10 μ l de muestra, que se filtraron para medir la actividad de la enzima en el líquido sobrenadante. Cuando se completó el proceso de inmovilización se adicionaron 5 mg de NaBH₄. La mezcla se sometió a agitación orbital sin tapar durante 30 minutos. La mezcla final se filtró sobre un plato poroso y se lavó con tampón fostato de sodio 50 mM pH 6. El derivado inmovilizado se conservó a 4 °C.

V.2.6.2.3. Estudio de carga enzimática del biocatalizador

Para optimizar la carga de proteína sobre el soporte de glioxil agarosa, se evaluaron diferentes cantidades de enzima por gramo de soporte. Las concentraciones utilizadas en la inmovilización fueron: 0,1, 0,5, 1, 1,5 y 2 mg enzima/ gramo de soporte. Se determinó en todos los casos la cantidad de proteína inmovilizada y su actividad en el derivado final (apartado V.2.4.1.2).

V.2.6.2.4. Estabilización frente a PH

Se añadieron 10 mg de soporte con enzima inmovilizada para medir la actividad hidrolítica utilizando el método discontinuo descrito en el apartado V.2.4.1.2. La hidrólisis se realizó a 37 °C utilizando *p*NF-β-Gal 5 mM como sustrato. Las mediciones enzimáticas se realizaron en presencia de tampon citrato/fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH 4 - 5,5, y fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH 5,5 - 9. La actividad enzimática obtenida para cada valor de pH se expresó como actividad relativa respecto al valor máximo hallado y el error promedio del experimento (expresado como desviación estándar) no superó el 5%.

V.2.6.2.5. Reacción de transglicosidación con enzimas inmovilizadas

Las reacción se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado V.2.4.2.2, añadiendo 10 UI de soporte inmovilizado con la enzima. Pasado el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar el biocatalizador y finalizar la reacción. El sobrenadante se conservó para medir la actividad enzimática por HPLC (apartado V.2.7.1).

V.2.6.2.6. Reutilización

V.2.6.2.6.1 Reutilización en reacciones de hidrólisis

Se disolvieron 5 UI de β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7. Se midió su actividad hidrolítica usando como sustrato *p*NF- β -Gal 5 mM según el método continuo descrito en el apartado V.2.4.1.2.1. Pasado el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el soporte con la enzima inmovilizada fue lavado dos veces con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7. Para los sucesivos reusos se añadió de nuevo medio de reacción.

V.2.6.2.6.2 Reutilización en reacciones de transglicosidación

Se disolvieron 10 UI de β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 con el objetivo de llevar a cabo la reacción en tres medios de reacción diferentes: i) tampón, ii) tampón y 2M del derivado de biomasa S13, y iii) tampón y 30% del LI [Bmim][PF₆], para un volumen final de 1 ml. La reacción se llevó a cabo utilizando concentración final de 85 mM de *p*NF- β -Gal como donador, y 425 mM de GlcNAc como aceptor, a 37 °C, durante 1,5 h en agitación orbital. Pasado el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se conservó para medir la actividad enzimática por HPLC (apartado V.2.7.1). El soporte con la enzima inmovilizada fue lavado dos veces con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6. Para los sucesivos reusos se añadió de nuevo medio de reacción. Puesto que el [Bmim][PF₆] se podía reutilizar porque precipitaba al centrifugar, no fue necesario volver a añadir este co-solvente en los distintos reusos.

V.2.7. Técnicas Analíticas

V.2.7.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

V.2.7.1.1. HPLC para el análisis de oligosacáridos

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de transglicosidación se realizó mediante un cromatógrafo Jasco 2000 equipado con una columna NH₂P50-4E de

grupos amino (Asahipak, Japón): diámetro interno: 4,6 mm, longitud 250 mm, tamaño de partícula: 5 μ m. Las condiciones de operación fueron: Flujo 0,8 mL/min, fase móvil de 80 % acetonitrilo y 20 % de agua (v/v). El sistema tiene tres detectores: uno luz ultravioleta (UV) y otro de dicroísmo circular (DC) fijados a 317 nm (máximo de absorción de los derivados de *p*NF y un detector de dispersión de la luz por evaporación (“*evaporative light scattering detector*”, ELSD). Las condiciones de trabajo con este último detector fueron: temperatura del tubo de deriva [DT]: 60 °C y de la cámara de spray [SC]: 54 °C

Las alícuotas obtenidas de las distintas reacciones de este trabajo, se diluyeron 10 veces y se filtraron para ser analizadas por HPLC-ELSD. De los datos obtenidos en el cromatograma se estimaron las proporciones de disacáridos mediante la metodología de calibración absoluta (o del estándar externo): se utilizó un estándar externo de disacáridos puros (Gal- β (1-3)-GlcNAc, Gal- β (1-3)-GalNAc, Gal- β (1-6)-GlcNAc Gal- α -(1-6)-Glu-*p*NF y Gal- α -(1-6)-Man-*p*NF) de concentración conocida. Se realizó una recta de calibrado del área del compuesto en función de la concentración. Los datos se ajustaron a un modelo polinómico de primer grado y se evaluaron por su valor de R^2 .

El detector UV se utilizó para estimar en el cromatograma la distribución de los grupos *p*-nitrofenol liberados y/o condensados durante la reacción, ya que éstos (sin ionizar) absorben normalmente a 317 nm. Los glicoconjugados con estos anillos aromáticos se detectaron también por DC (317 nm), ya que la presencia de dobles enlaces del sistema aromático cerca de un centro quiral como es el carbono anomérico permiten ser detectados con ésta técnica.

V.2.7.1.2. HPLC para el análisis de glicodendrimeros

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de sialización de glicodendrimeros se realizó en un cromatógrafo Shimadzu equipado con un detector de diodo-array e

inyector automático. La columna utilizada era de modelo XBridge. c18, de 3 mm de diámetro interno, 150 mm de longitud y un tamaño de partícula de 3,6 µm. Las condiciones de operación fueron: flujo 0,4 ml/min, fase móvil compuesta por disolvente A: agua 99,9%, ácido trifluoroacético 0,1%, y disolvente B: acetonitrilo 95%, agua, 4,9% y 0,1% ácido trifluoroacético. El gradiente programado para cada pinchazo aparece en la **Tabla 37**. Las alícuotas obtenidas de las distintas reacciones (50 µl) se diluyeron 10 veces con 225 µl de agua y 225 µl de acetonitrilo, y se filtraron. Posteriormente se introdujeron en los viales del inyector automático.

Tabla 37. Condiciones de gradiente de la composición de la fase móvil para el análisis de glicodendrimeros por HPLC.

t (min)	Disolvente	
	A (%)	B (%)
0	100	0
25	55	45
30	0	100
35	0	100
45	100	0

V.2.7.1.3. HPLC para el análisis de glicopeptidos

V.2.7.1.3.1 Método general para el análisis de glicopéptidos

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de modificación estructural de glicopéptidos se realizó en un cromatógrafo Agilent 1200 equipado con un detector UV programado a 270 nm. La columna utilizada era de modelo Mediterranea, Sea18, de 4,6 mm de diámetro interno, 150 mm de longitud y un tamaño de partícula de 5 µm. Las condiciones de operación fueron: flujo 1 ml/min, fase móvil compuesta por disolvente A: agua 99,9%, ácido trifluoroacético 0,1%, y disolvente B: acetonitrilo 99,9%, ácido trifluoroacético 0,1%. El gradiente programado para cada pinchazo aparece en la **Tabla 38**. Las alícuotas obtenidas de las distintas reacciones (50 µl) se diluyeron con 50 µl de acetonitrilo y se filtraron con un filtro de 0,2 µm.

Tabla 38. Condiciones de gradiente de la composición de la fase móvil para el análisis de glicopéptidos por HPLC

t (min)	Disolvente	
	A (%)	B (%)
0	100	0
5	100	0
15	75	25
30	65	35
35	0	100
45	100	0
50	100	0

V.2.7.1.3.2 Método para el análisis reacciones de oxidación de glicopeptidos

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de oxidación de glicopéptidos se realizó en un cromatógrafo Agilent 1200 equipado con un detector UV programado a 270 nm. La columna era de modelo NH₂P50-4E de grupos amino (Asahipak, Japón): diámetro interno: 4,6 mm, longitud 250 mm, tamaño de partícula: 5 µm. Las condiciones de operación fueron: Flujo 1 ml/min, fase móvil compuesta por tampón fosfato de sodio 10 mM pH 8 al 60 % y acetonitril al 40%. Las alícuotas obtenidas de las distintas reacciones (50 µl) se diluyeron con 50 µl de acetonitrilo y se filtraron con un filtro de 0,2 µm.

V.2.7.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de ¹H-RMN de los disacáridos purificados y los glicodendrimeros de la serie DA se realizaron con presaturación de agua deuterada (D₂O) y los de la serie DD en DMSO deuterado, en un espectrómetro Bruker AC-250 de 250 MHz. En el caso de muestras muy diluidas o para espectros de ¹³C-RMN se utilizó el espectrómetro Bruker Av de 500 MHz ó de 700 MHz.

V.2.7.3. Espectroscopía de Fluorescencia

Se analizó el espectro de emisión de fluorescencia de la enzima β -gal-3 utilizando un espectrómetro Perkin Elmer LS50B. Se excitó la proteína a una longitud de onda de 295 nm, la emisión fue adquirida de 310 nm a 400 nm. La excitación y emisión de ancho de banda se ajustó a 3 nm, las mediciones se hicieron en celdas de 1 cm de paso de luz con un termorregulador TLC ajustado a 25°C. El análisis se realizó utilizando el software Spectra Félix 32. Primero se analizó el espectro de S13 en una concentración 2M, después el de la enzima β -gal-3 en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 para poder compararlos y confirmar que la emisión de S13 era inapreciable comparada con la de la enzima y que no interferiría en las mediciones. Después se realizaron varias adiciones de S13 en la cubeta con la enzima, logrando las siguientes concentraciones finales: 0, 1, 2 y 3M. Se registraron los espectros de emisión para dichas mezclas y se representó la fluorescencia normalizada en función de la λ .

V.2.7.4. Resonancia de Plasmón de superficie (SPR)

Los análisis se realizaron en un equipo Biacore 3000 (GE Healthcare). Se utilizaron tres tipos de chip:

- CM5: contiene una superficie de oro funcionalizada con una matriz de dextrano de 100 nm. Esta matriz está funcionalizada con grupos carboxilo lo cual permite la inmovilización covalente mediante distintos métodos químicos.
- CM4: similar al CM5 pero con una funcionalización del dextrano del 30%, lo que reduce la señal y evita uniones inespecíficas.
- HPA: contiene cadenas de alcanotioles unidas directamente a la lámina de oro, lo que crea una superficie hidrofóbica que permite el estudio de interacciones de componentes lipídicos.

Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de tampón PBST (fosfato de sodio 10 mM pH 7,4 con cloruro de sodio 150 mM y 0,005% de P20) con los chips CM5 y CM4, mientras que se utilizó el tampón HBS (tampón HEPES 10 mM pH 7,4 con

cloruro de sodio 150 mM) para el chip HPA. Cada chip tiene cuatro celdas FC (Flow Cell).

V.2.7.4.1. Preparación de chips CM5 y CM4

V.2.7.4.1.1 Activación de chips CM5 y CM4

Para llevar a cabo la activación de los grupos carboxilo de la matriz de dextrano los reactivos utilizados fueron: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). El protocolo de activación consistió en la inyección de 35 μL de una mezcla de EDC (0,2 M) y NHS (0,05 M), a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ de flujo, temperatura constante de 28 $^{\circ}\text{C}$ y empleando como tampón de trabajo PBST. Tras este procedimiento general de activación la superficie queda lista para inmovilizar el ligando.

V.2.7.4.1.2 Inmovilización de ligandos en la superficie del chip

Una vez activado el chip, se fluyen los ligandos, que quedan unidos por sus grupos amino libres, como se muestra en la **Figura 96**. En este trabajo se desarrollaron dos tipos de experimentos para el estudio de interacciones moleculares por SPR, en los cuales, las condiciones de inmovilización de ligandos son diferentes. Por ello éstas, se explican en sus respectivos apartados:

-Interacciones glicodendrímico-proteína, apartado **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

-Interacciones glicopéptido-precursor de péptidoglicano, apartado V.2.7.4.2.

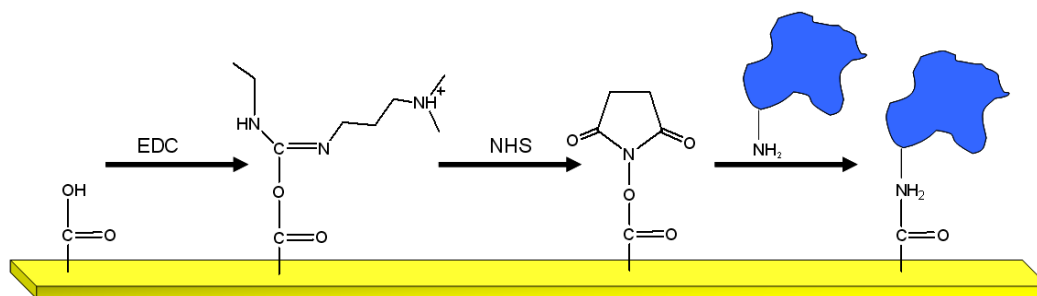


Figura 96. Activación de los grupos carboxilo de los chips CM5 y CM4 con EDC y NHS, y posterior unión del ligando a través de sus grupos amino libres.

V.2.7.4.1.3 Bloqueo de grupos activados del chip CM5 y CM4.

Después del proceso de inmovilización de los ligandos en los chips activados, es posible que queden grupos carboxilos de la matriz activados donde no se haya producido la inmovilización. Para evitar que estos grupos remanentes puedan interferir en los estudios de interacción, se bloqueó la superficie mediante una inyección de etanolamina (1 M, 35 μ l) a un flujo de 5 μ l/min y 28°C y empleando como tampón de trabajo PBST.

V.2.7.4.2. Estudio de interacciones glicopéptido-precursores de peptidoglicano

V.2.7.4.2.1 Inmovilización de los tripéptidos AcLysDAlaDAla y AcLysDAlaDLactato sobre la superficie del chip CM5 y CM4

Los ligandos AcLysDAlaDAla y AcLysDAlaDLactato fueron inmovilizados en celdas independientes (FC2 y FC3 respectivamente), para ello se utilizó una concentración de 2 mg/ml en tampón fosfato de sodio 10 mM pH8, a un flujo de 5 μ l/min.

Las respuestas de inmovilización para AcLysDAlaDAla (FC2) y AcLysDAlaDLactato (FC3) fueron 166 RU y 196 RU respectivamente en el chip CM5 y 83 RU y 69 RU respectivamente en el chip CM4. La celda FC1 de cada chip fue activada y bloqueada sin ligando para ser utilizada como referencia.

V.2.7.4.2.2 Estudio de interacciones moleculares de glicopéptidos con precursores de peptidoglicano

V.2.7.4.2.2.1 Chip CM5

Las muestras fueron inyectadas a un flujo de 5 μ l/min en tampón PBST durante 180 s y midiendo después durante 180 s. Las concentraciones para vancomicina fueron:

25, 50 100, 150, 200 y 250 nM; para teicoplanina y A-40926: 5, 10, 15, 20, 25, 25, 30 nM; para mideplanina: 0,5, 1, 2, 5, 7,5 y 10 nM; para dalbavancina y MDL 63,246: 1, 2, 5, 7,5, 10 y 12,5 nM.

V.2.7.4.2.2.2 Chip CM4

Las muestras fueron inyectadas a un flujo de 5 μ l/min en tampón PBST midiendo durante 180 s y midiendo después la disociación se durante 180 s. Las concentraciones para vancomicina fueron: 200, 300, 400, 500 and 600 nM; para teicoplanina: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 nM; para A-40926: 20, 40, 80, 120, 160 and 200 nM; para mideplanina, dalbavancina y MDL 63,246: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 nM.

V.2.7.4.2.2.3 Chip HPA

Se inyectaron soluciones 10 μ M de todos los glicopéptidos con un flujo de 5 μ l/min durante 180 s y la disociación se midió durante 180 s en tapón HBS

El procesamiento de datos y los analisis de resultados se llevaron a cabo mediante el programa BiaEvaluation v.4.1.1 (GE Healthcare). A todas las señales se les restó el blanco y fueron ajustadas a un modelo matemático para obtener los parámetros cinéticos de la interacción.

V.2.8. Herramientas informáticas

V.2.8.1. Programas bioinformáticos

V.2.8.1.1. Análisis de secuencias genéticas

Para el ensamblado, comparación, y traducción de secuencias génicas, se utilizaron diferentes programas: Chromas Lite junto con ClustalW (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute), Bioedit (Tom Hall Ibis Therapeutics) y Vector NTI (Invitrogen).

V.2.8.1.2. Anál isis de secuencias proteí cas

La comparación de secuencias peptídicas, búsqueda de proteínas homólogas o análisis de proteínas, como cálculo de su punto isoelectrí co, su masa molecular o la predicción de posibles fragmentos transmembrana de proteínas, se realizó con los paquetes de programas del servidor ExPASy: BLAST (Altschul y *col.* 1990), pI/MW, ProtParam, y otros programas en distintos servidores como “DAS” (Cserzo y *col.* 1997), “HMMTOP” (Tusnady y *col.* 1998), “TMMOD” (Kahsay y *col.* 2005) o “Sosui” (Hirokawa y *col.* 1998).

V.2.8.2. Modelado molecular y docking de la interacción co-solvente-enzima β -Gal-3

V.2.8.2.1. Modelado por homología

Debido a que no existía previamente una estructura cristalizada de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans*, se generó un modelo tridimensional por homología. Para ello, mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y *col.* 1990) se localizó la estructura cristalizada con mayor similitud de secuencia que estuviera depositada en el Protein Data Bank (PDB), encontrándose la β -galactosidasa de *Bacterioides thetaiotaomicron* (PDB ID: 3D3A, resolución 2.15 Å) con una identidad del 42% (e-value: $1e^{-146}$), por lo que fue seleccionada para desarrollar el modelo. Se utilizaron dos servidores de modelado automático, el SWISS-Model (Schwede y *col.* 2003) y el CPHmodels-3.0, para construir el modelo basado en el alineamiento con la β -galactosidasa de *B. thetaiotaomicron*. Los modelos obtenidos fueron posteriormente refinados con el programa GROMOS 96 para obtener la estructura de mínima energía pasando por mil pasos del algoritmo Steepest Descent. Para la validación y selección del mejor modelo, se empleó el programa para calcular la torsión de los ángulos de la cadena principal: PROCHECK (Laskowski y *col.* 1993) (gráfico de Ramachandran) y se verificó mediante la línea software de ERRAT (Colovos y *col.* 1993) y VERIFY_3D54 en el servidor de

análisis estructural y comprobación de UCLA-DOE. La mayoría de los parámetros analizados tuvieron valores estadísticos que estaban en el intervalo esperado para una proteína natural plegada y, por tanto, el modelo fue considerado validado.

V.2.8.2.2. Localización del centro activo

La ausencia de una estructura cristalina del complejo, obligó a deducir la localización del centro activo por medio de análisis de la conservación de los residuos, de docking ciego y estructura de superimposición. Un análisis comparativo de los residuos catalíticos de las secuencias de la β -galactosidasa de *E. coli* (LacZ) y la β -Gal-3 de *B. circulans* produjo, como resultado, una perfecta conservación de dos restos de ácido glutámico, Glu-157 y Glu-233, correspondiente a los residuos 461 (ácido catalítico) y 537 (nucleófilo) respectivamente en el sistema LacZ de *E. coli* (Juers y col. 2001). La estructura de la cadena A de lacZ (código PDB 1DP0) fue superpuesta al modelo utilizando PyMOL. Se observó una muy buena superposición de los residuos analizados, lo que podría representar un típico centro activo de β -galactosidasa en la que los dos residuos de glutámico se colocaron a una distancia de 5,5 Å, distancia usual para esta clase de enzimas. Finalmente, se realizó un docking ciego utilizando toda la estructura como la cuadrícula utilizada y los resultados confirmaron el hipotético centro activo.

V.2.8.2.3. Docking

Los procedimientos de docking se llevaron a cabo con el software Autodock 4 (Morris y col. 2009), utilizando el algoritmo genético Lamarckiano estándar y con una cuadrícula de 60 x 60 x 60 puntos alrededor del residuo Glu-233, para abarcar todos los residuos implicados en el mecanismo, y con un espaciado de malla de 0,375 Å.

Se realizaron dos docking: inicialmente el *p*NF- β -Gal se acopló en el centro activo para determinar la posición de la molécula en el intermedio glicosil-enzima. Con este

objetivo, se seleccionó la mejor estructura de acuerdo a la geometría (lo suficientemente cerca para el nucleófilo Glu-233) y criterios energéticos (energía favorable), para finalmente establecer un enlace covalente entre el residuo Glu-233 y la galactosa. El complejo Gal-enzima fue utilizado para realizar un acoplamiento con el GlcNAc, se seleccionó la mejor solución teniendo en cuenta, solamente, criterios energéticos. Este resultado se tomó como una estructura de partida para posteriores estudios de dinámica molecular.

V.2.8.2.4. Parametrización del disolvente

Los disolventes S13 y [Bmim][PF₆] se utilizaron para simular el sistema de reacción y solvatar la proteína, con el fin de modelar el cambio en la estereoselectividad inducida por el disolvente y obtener una visión de los detalles moleculares de este proceso. Debido a la falta de parámetros de los disolventes para programa GROMOS 96 43a1, se llevó a cabo la parametrización de estas moléculas. La estructura fue optimizada dentro del marco de la densidad funcional teórica (DFT), en el nivel de B3LYP/6-31G**, utilizando el paquete MPQC (*“Massively Parallel Quantum Chemistry”*). Todos los parámetros (longitudes de enlace, ángulos y diedros) y las cargas fueron extraídos de los cálculos del campo de fuerza estándar.

Para comprobar los parámetros, se estableció un sistema de prueba formando una caja cúbica con 216 moléculas de disolvente. Este cubo fue equilibrado durante 300 ps a 298 K y 1 atm. A continuación, se llevó a cabo una simulación de 5 ps en las mismas condiciones de presión y temperatura, grabando los valores de posición y energía cada 1ps.

V.2.8.2.5. Dinámica molecular

Se generaron simulaciones de dinámica molecular con la mejor solución de docking y el sistema intermedio glicosil-enzima. Los parámetros adoptados en GROMOS 96 43a1 se utilizaron para la proteína y para el residuo galactosa-glutámico. Los

parámetros para el GlcNAc se extrajeron de Dundee PRODRG 2.5 Server (beta) y se comprobaron las cargas.

Se utilizó el programa GROMACS v4.0.7 suite (Hess y *col.* 2008) para desarrollar una minimización inicial del complejo con 2000 pasos del algoritmo Steepest Descent seguido de 7000 pasos de gradientes conjugados de Polak-Ribiere. El complejo minimizado fue solvatado en tres cajas cúbicas diferentes, cumpliendo los requisitos mínimos de distancia de 1,2 nm entre cualquier átomo del complejo y las caras de las cajas. La primera caja se llenó con moléculas de agua para reproducir las condiciones experimentales para la enzima, mientras que la segunda y tercera cajas fueron llenadas con una mezcla de moléculas de agua y moléculas de S13 y [Bmim][PF₆] respectivamente, para reproducir las condiciones experimentales en las que se observó el cambio en la regioselectividad. Luego, se realizó para cada caja, un nuevo proceso de 500 pasos de minimización de Steepest Descent y luego 3000 pasos de gradientes conjugados. Los sistemas fueron equilibrados por 300 ps a 300K para condiciones constantes de moles, volumen y temperatura utilizando el método y luego otros 300 pasos a 300K para condiciones constantes de moles, presión y temperatura. Finalmente se llevó a cabo una simulación de 2 ns midiendo la energía y las coordenadas cada 1 ps y un paso de 2 fs (Amadei y *col.* 1993).

V.2.8.3. Modelado molecular y docking de la interacción glicopéptido-precursor de peptidoglicano

Los cálculos de mecánica molecular de los antibióticos en presencia de los precursores de peptidoglicano se llevaron a cabo el programa Macromodel 9.6, del paquete de programas Maestro (versión 8.5.110). Las estructuras de los antibióticos fueron construidas a partir de los complejos entre precursores de peptidoglicano y vancomicina, teicoplanina y otros antibióticos relacionados, depositados en el Protein Data Bank (códigos PDB 1FVM, 1QD8, 2WDX y 3MG9). Las cadenas laterales de los diferentes antibióticos se modelaron desde estos archivos cuando fue necesario.

Para el modelado de AcLysDAlaDAlaOH, se seleccionó la geometría inicial del archivo 1FVM. AcLysDAlaDLactato se modeló modificando los átomos afectados. Una vez obtenidos los modelados de los precursores de peptidoglicano, se acoplaron manualmente para cumplir con el patrón de puentes de hidrógeno descrito. De los complejos obtenidos se buscó su estructura de mínima energía utilizando el algoritmo OPLS* force field (Optimized Potentials for Liquid Simulations), con una constante dieléctrica de distancia de dependencia de 70 debyes.

Los complejos de mínima energía obtenidos fueron utilizados para llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular de 1 ns y 300 K, a partir del mismo algoritmo y sin restricciones intermoleculares para confirmar la estabilidad conformacional de los complejos. El tiempo de equilibrado fue 100 ps, el paso de integración fue 1,5 fs y se activó el protocolo de agitación para los enlaces C-H. Para todos los casos la temperatura fue estable en 2°. Para los complejos con AcLysDAlaDAlaOH, la geometría se mantuvo estable durante todo el proceso de dinámica molecular, manteniéndose los puentes de hidrógeno intermoleculares durante más del 80% del tiempo de simulación. Se observaron variaciones en la orientación y los patrones de puentes de hidrógenos del extremo C-terminal del AcLysDAlaDAlaOH, mientras que los complejos con AcLysDAlaDLactato se disociaban después de 200 ps de simulación, indicando que tenían una estabilidad mínima.

Adicionalmente, se utilizó el programa AutoDock 4.2 para buscar geometrías alternativas de los complejos. Los tipos de átomos y las cargas parciales de cada región de la molécula fueron calculados utilizando el programa Sybyl 8.0. Las geometrías iniciales de los antibióticos obtenidas del Protein Data Bank fueron optimizadas con el programa Macromodel, del paquete de programas Maestro. Concretamente, después de añadir los átomos de hidrógeno, las estructuras fueron optimizadas con el algoritmo OPLS-2005* force field utilizando gradientes conjugados por el método de Newton Truncado y los ligandos fueron fijados a sus posiciones cristalográficas. Entonces, los ligandos fueron extraídos de la zona de

unión del antibiótico para obtener las nuevas coordenadas de la estructura de los antibióticos. Para los cálculos de AutoDock, con una cuadrícula de 54x54x54 puntos y 0,375 Å de tamaño de malla. Se calcularon 200 pasos de algoritmo genético lamarckiano, utilizando 2×10^7 evaluaciones. El análisis sistemático de las diferentes conformaciones de unión se obtuvo agrupando los resultados con una desviación típica de 1,8 Å. La conformación obtenida manualmente estuvo siempre entre las dos mejores conformaciones obtenidas por AutoDock.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. Bibliografía

- Aires-Trapote, A. (2012). Diseño y síntesis de soportes poliméricos porosos para la obtención de nuevos biocatalizadores y su aplicación en procesos de química sostenible. Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica, Universidad Autónoma de Madrid. **Tesis Doctoral**.
- Akgöl, S. and A. Denizli (2004). "Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption." J. Mol. Cat. B: Enz. **28**(1): 7-14.
- Akkaya, B., L. Uzun, F. Candan and A. Denizli (2007). "N-methacryloyl-(l)-histidine methyl ester carrying porous magnetic beads for metal chelate adsorption of cytochrome c." Materials Science and Engineering: C **27**(1): 180-187.
- Alcalde, M., M. Ferrer, F. J. Plou and A. Ballesteros (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." Trends Biotechnol. **24**: 281-287.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. **215**(3): 403-410.
- Alvarez, L., C. Bricio, M. J. Gomez and J. Berenguer (2011). "Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains." Appl Environ Microbiol **77**(4): 1352-1358.
- Allen, N. E., D. L. LeTourneau, J. N. Hobbs, Jr. and R. C. Thompson (2002). "Hexapeptide derivatives of glycopeptide antibiotics: tools for mechanism of action studies." Antimicrob Agents Chemother **46**(8): 2344-2348.
- Amadei, A., A. B. M. Linssen and H. J. C. Berendsen (1993). "Essential dynamics of proteins." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **17**(4): 412-425.
- Ames, D. E., D. Bull and C. Takundwa (1981). "A Convenient Synthesis of Ethynyl-N-heteroarenes." Synthesis **1981**(05): 364-365.
- Anastas, P. T. and J. C. Warner (1998). Green chemistry: theory and practice. New York.
- Anastas, P. T. K., Mary M. (2002). "Origins, current status, and future challenges of green chemistry." Acc. Chem. Res. **35**(9): 686-694.
- Angulo, J., Langpap, B., Blume, A., Biet, T., Meyer, B., Krishna, N. R., Peters, H., Palcic, M. M., Peters, T. (2006). "Blood group B galactosyltransferase: Insights into substrate binding from NMR experiments." J Am Chem Soc **128**(41): 13529-13538.
- Armougom, F., S. Moretti, V. Keduas and C. Notredame (2006). "The iRMSD: a local measure of sequence alignment accuracy using structural information." Bioinformatics **22**(14): e35-e39.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.
- Ashida, H., H. Ozawa, K. Fujita, S. Suzuki and K. Yamamoto (2010). "Synthesis of mucin-type O-glycopeptides and oligosaccharides using transglycosylation and reverse-hydrolysis activities of *Bifidobacterium* endo- α -N-acetylgalactosaminidase." Glycoconj. J. **27**(1): 125-132.

- Attri, P., P. Venkatesu and A. Kumar (2012). "Water and a protic ionic liquid acted as refolding additives for chemically denatured enzymes." Organic & biomolecular chemistry **10**(37): 7475-7478.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. New York, USA, John Wiley & Sons.
- Axelsen, P. H. and D. Li (1998). "A rational strategy for enhancing the affinity of vancomycin towards depsipeptide ligands." Bioorg Med Chem **6**(7): 877-881.
- Baisch, G., Öhrlein, R., Streiff, M., Kolbinger, F. (1998). "On the preparative use of recombinant β (1-3)galactosyl-transferase." Bioorg Med Chem Lett **8**: 751-754.
- Balaram, P., Bothner-By, A. A., Dadok, J. (1972). "Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure." Journal of the American Chemical Society **94**(11): 4015-4017.
- Ball, P. (2000). H₂O: A Biography of Water. London, Phoenix Press.
- Bankar, S. B., M. V. Bule, R. S. Singhal and L. Ananthanarayan (2009). "Glucose oxidase — An overview." Biotechnology Advances **27**(4): 489-501.
- Barbara, K. (2004). "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review." Enzym. Microb. Tech. **35**(2-3): 126-139.
- Barna, J. C. J., D. H. Williams, D. J. M. Stone, T. W. C. Leung and D. M. Doddrell (1984). "Structure Elucidation of the Teicoplanin Antibiotics." Journal of the American Chemical Society **106**(17): 4895-4902.
- Beauregard, D. A., A. J. Maguire, D. H. Williams and P. E. Reynolds (1997). "Semiquantitation of cooperativity in binding of vancomycin-group antibiotics to vancomycin-susceptible and -resistant organisms." Antimicrob Agents Ch **41**(11): 2418-2423.
- Bergey, D. H., D. R. Boone, G. M. Garrity, R. W. Castenholz, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes, Springer-Verlag New York.
- Bernal, C., M. Marciello, M. Mesa, L. Sierra, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo and J. M. Guisan (2013). "Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support." International Dairy Journal **28**(2): 76-82.
- Bernardi, A. and P. Cheshev (2008). "Interfering with the sugar code: design and synthesis of oligosaccharide mimics." Chemistry - A European Journal **14**(25): 7434-7441.
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer Jr, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi and M. Tasumi (1977). "The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures." J. Mol. Biol. **112**(3): 535-542.
- Berteau, O., Sandström, C., Bielicki, J., Anson, D. S., Kenne, L. (2003). "Glycosidase-substrate interactions analysis by STD-NMR spectroscopy: Study of α -L-fucosidase." Journal of the American Chemical Society **125**(50): 15296-15297.

- Bertozi, C. R. and L. L. Kiessling (2001). "Chemical Glycobiology." Science **291**(5512): 2357-2364.
- Bhunia, A., Jayalakshmi, V., Benie, A. J., Schuster, O., Kelm, S., Krishna, N. R., Peters, T. (2004). "Saturation transfer difference NMR and computational modeling of a sialoadhesin-sialyl lactose complex." Carbohydrate Research **339**(2): 259-267.
- Biacore, A. B. s. h., version 3.0 (1997). "Biacore, A. BIAevaluation software handbook, version 3.0."
- Biavasco, F., R. Lupidi and P. E. Varaldo (1992). "In vitro activities of three semisynthetic amide derivatives of teicoplanin, MDL 62208, MDL 62211, and MDL 62873." Antimicrob Agents Chemother **36**(2): 331-338.
- Billeter, M., M. J. Zervos, A. Y. Chen, J. R. Dalovisio and C. Kurukularatne (2008). "Dalbavancin: a novel once-weekly lipoglycopeptide antibiotic." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **46**(4): 577-583.
- Blanchard, J. E. and S. G. Withers (2001). "Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides." Chem. Biol. **8**(627-633).
- Blume, A., Angulo, J., Biet, T., Peters, H., Benie, A. J., Palcic, M., Peters, T. (2006). "Fragment-based screening of the donor substrate specificity of human blood group B galactosyltransferase using saturation transfer difference NMR." J Biol Chem **281**(43): 32728-32740.
- Boas, U. and P. M. Heegaard (2004). "Dendrimers in drug research." Chem Soc Rev **33**(1): 43-63.
- Boeckmann, B., A. Bairoch, R. Apweiler, M. C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M. J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout and M. Schneider (2003). "The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003." Nucleic Acids Res. **31**(1): 365-370.
- Böhm, G. and H. Waldmann (1995). "Synthesis of glycosides of fucose under neutral conditions in solutions of LiClO₄ in organic solvents." Tetrah. Lett. **36**(22): 3843-3846.
- Bojarova, P. and V. Kren (2009). "Glycosidases: a key to tailored carbohydrates." Trends Biotechnol. **27**(4): 199-209.
- Boltje, T. J., T. Buskas and G.-J. Boons (2009). "Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research." Nat. Chem. **1**(8): 611-622.
- Boller, T., C. Meier and S. Menzler (2002). "Eupergit oxirane acrylic Beads: how to make enzymes fit for biocatalysis." Organic Process Research & Development **6**(4): 509-519.
- Bornscheuer, U. and R. Kazlauskas (1999). Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations., Weinheim:Wiley/VCH.
- Bornscheuer, U. T. (2003). "Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts." Angewandte Chemie International Edition **42**(29): 3336-3337.
- Bousquet, M.-P., Willemot, R.-M., Monsan, P., Boures, E. (1998). "Production, purification, and characterization of thermostable α -transglucosidase from

- Talaromyces duponti*-application to α -alkylglucoside synthesis." Enzyme Microbial Technol **23**: 83-90.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**(1-2): 248-254.
- Branneby, C., P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck and P. Berglund (2003). "Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes." Journal of the American Chemical Society **125**: 874-875.
- Brás, N., P. Fernandes and M. Ramos (2009). "Docking and molecular dynamics studies on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates." Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta) **122**(5): 283-296.
- Breton, C., Imberty, A. (1999). "Structure/function studies of glycosyltransferases" Curr Opin Struct Biol **9**: 563-571.
- Bridiau, N., N. Issaoui and T. Maugard (2010). "The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of *N*-acetyl-lactosamine synthesis, using the β -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media." Biotechnol. Prog. **26**(5): 1278-1289.
- Brock, T. D. and H. Freeze (1969). "*Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non sporulating extreme thermophile." J. Bacteriol. **98**((1)): 289-297.
- Bröder, W. and H. Kunz (1993). "A new method of anomeric protection and activation based on the conversion of glycosyl azides into glycosyl fluorides." Carbohydr. Res. **249**(1): 221-241.
- Buchholz, K., V. Kasche and U. T. Bornscheuer (2005). Biocatalysts and enzyme technology, Wiley-VCH.
- Bugg, T. D. H., G. D. Wright, S. Dutkamalen, M. Arthur, P. Courvalin and C. T. Walsh (1991). "Molecular-Basis for Vancomycin Resistance in Enterococcus-Faecium Bm4147 - Biosynthesis of a Depsipeptide Peptidoglycan Precursor by Vancomycin Resistance Proteins Vanh and Vana." Biochemistry **30**(43): 10408-10415.
- Buhleier, E., W. Wehner and F. VÖGtle (1978). ""Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies." Synthesis **1978**(02): 155-158.
- Caines, M. E. C., H. Zhu, M. Vuckovic, L. M. Willis, S. G. Withers, W. W. Wakarchuk and N. C. J. Strynadka (2008). "The Structural Basis for T-antigen Hydrolysis by *Streptococcus pneumoniae*." J. Biol. Chem. **283**(46): 31279-31283.
- Calvo, P., M. G. Santamaria, M. J. Melgar and J. A. Cabezas (1983). "Kinetic evidence for two active sites in beta-D-fucosidase of *Helicella ericetorum*." Int J Biochem **15**(5): 685-693.
- Campbell, J. A., G. J. Davies, V. Bulone and B. Henrissat (1997). "A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities." The Biochemical journal **326 (Pt 3)**: 929-939.

- Candiani, G., M. Abbondi, M. Borgonovi, G. Romano and F. Parenti (1999). "In-vitro and in-vivo antibacterial activity of BI 397, a new semi-synthetic glycopeptide antibiotic." *J Antimicrob Chemoth* **44**(2): 179-192.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics." *Nucleic Acids Res.* **37**(D): 233-238.
- Capello, C., U. Fischer and K. Hungerbühler (2007). "What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents." *Green Chem.* **9**(9): 927-934.
- Cardin, A. and H. Weintraub (1989). "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **9**(1): 21-32.
- CDC (2002). "Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**(26): 565-567.
- Cerdobbel, A., T. Desmet, K. De Winter, J. Maertens and W. Soetaert (2010). "Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent immobilization." *Journal of Biotechnology* **150**(1): 125-130.
- Cetinus, S. A., H. N. Öztóp and D. Saraydin (2007). "Immobilization of catalase onto chitosan and cibacron blue F3GA attached chitosan beads." *Enzym. Microb. Tech.* **41**(4): 447-454.
- Claasen, B., M. Axmann, R. Meinecke and B. Meyer (2005). "Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin α (IIb) β 3 in native platelets than in liposomes." *Journal of the American Chemical Society* **127**(3): 916-919.
- Claridge, T. D. W. (1999). *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, Pergamon. Elsevier Science.
- Clark, L. C., Jr. and C. Lyons (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." *Ann N Y Acad Sci* **102**: 29-45.
- Cobucci-Ponzano, B. and M. Moracci (2012). "Glycosynthases as tools for the production of glycan analogs of natural products." *Nat Prod Rep* **29**(6): 697-709.
- Cobucci-Ponzano, B., A. Strazzulli, M. Rossi and M. Moracci (2011). "Glycosynthases in Biocatalysis." *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**(13): 2284-2300.
- Cobucci-Ponzano, B., C. Zorzetti, A. Strazzulli, S. Carillo, E. Bedini, M. M. Corsaro, D. A. Comfort, R. M. Kelly, M. Rossi and M. Moracci (2011). "A novel α -D-galactosynthase from *Thermotoga maritima* converts β -D-galactopyranosyl azide to α -galacto-oligosaccharides." *Glycobiology* **21**(4): 448-456.
- Colabella, J. and L. Chagan (2008). "Dalbavancin (zeven), a novel glycopeptide for resistant gram-positive organisms." *P T* **33**(1): 42-57.

- Colombo, G. and G. Carrea (2002). "Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations." Journal of Biotechnology **96**(1): 23-33.
- Colombo, G., G. Ottolina and G. Carrea (2000). "Modelling of enzyme properties in organic solvents." Monatsh. Chem. **131**(527-547): 527-547.
- Colovos, C. and T. Yeates (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." Prot. Sci. **2**: 1511-1519.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." FEMS Microbiol Rev **29**(1): 3-23.
- Coolbear, T., R. M. Daniel and H. W. Morgan (1992). "The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance." Adv Biochem Eng Biotechnol **45**: 57-98.
- Cooper, M. A., M. T. Fiorini, C. Abell and D. H. Williams (2000). "Binding of vancomycin group antibiotics to D-alanine and D-lactate presenting self-assembled monolayers." Bioorganic & Medicinal Chemistry **8**(11): 2609-2616.
- Correa da Costa, R., T. Buffeteau, A. D. Guerzo, N. D. McClenaghan and J.-M. Vincent (2011). "Reversible hydrocarbon/perfluorocarbon phase-switching of [Ru(bipy)₃]²⁺ driven by supramolecular heteromeric fluorine carboxylate-carboxylic acid H-bond interactions." Chem. Commun. **47**(29): 8250-8252.
- Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci." Clinical Infectious Diseases **42**: S25-S34.
- Crout, D. H. G. and G. Vic (1998). "Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis." Curr. Opin. Chem. Biol. **2**(1): 98-111.
- Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson (1997). "Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method." Protein Eng **10**(6): 673-676.
- Charette, A. B., M. K. Janes and A. A. Boezio (2001). "Mitsunobu reaction using triphenylphosphine linked to non-cross-linked polystyrene." J Org Chem **66**(6): 2178-2180.
- Chen, X. and A. Varki (2010). "Advances in the biology and chemistry of sialic acids." ACS Chem Biol **5**(2): 163-176.
- Cheng, J., S. Huang, H. Yu, Y. Li, K. Lau and X. Chen (2010). "Trans-sialidase activity of *Photobacterium damsela* alpha2,6-sialyltransferase and its application in the synthesis of sialosides." Glycobiology **20**(2): 260-268.
- Chiappe, C. and D. Pieraccini (2005). "Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity." J. Phys. Org. Chem. **18**(4): 275-297.
- Chiou, S. H. and W. T. Wu (2004). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups." Biomaterials **25**(2): 197-204.
- Christensen, S. B., H. S. Allaudeen, M. R. Burke, S. A. Carr, S. K. Chung, P. DePhillips, J. J. Dingerdissen, M. DiPaolo, A. J. Giovenella, S. L. Heald and et al. (1987). "Parvodisin, a novel glycopeptide from a new species,

- Actinomadura parvosata: discovery, taxonomy, activity and structure elucidation." *J Antibiot* **40**(7): 970-990.
- D. G. Myszka (1997). "Kinetic analysis interactions using surface plasmon resonance." *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 50-57.
- da Costa, M. S., Nobre, M.F., and Rainey, F (2001). Genus *Thermus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1*. G. M. Garrity. New York, USA, Springer: 404–414.
- da Silva, G. P., M. Mack and J. Contiero (2009). "Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology." *Biotechnol. Adv.* **27**(1): 30-39.
- Dabdoub, M. J., V. B. Dabdoub and E. J. Lenardão (2001). "Synthesis of 1-methyl-4-alkyl-1,3-diacetylenes. Prototropic rearrangement in 1-alkyl-1,3-diacetylenes." *Tetrahedron Letters* **42**(10): 1807-1809.
- Daines, A. M., B. A. Maltman and S. L. Flitsch (2004). "Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**(2): 106-113.
- Dameron, A. A., T. J. Mullen, R. W. Hengstebeck, H. M. Saavedra and P. S. Weiss (2007). "Origins of Displacement in 1-Adamantanethiolate Self-Assembled Monolayers." *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **111**(18): 6747-6752.
- Damm, K. and H. Carlson (2006). "Gaussian-Weighted RMSD superposition of proteins: A structural comparison for flexible proteins and predicted protein structures." *Biophys. J.* **90**(12): 4558-4573.
- Dasari, M. A., P. P. Kiatsimkul, W. R. Sutterlin and G. J. Suppes (2005). "Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol." *Appl. Catal. A* **281**(1-2): 225-231.
- Dasgupta, S. and M. Nitz (2011). "Use of *N,O*-dimethylhydroxylamine as an anomeric protecting group in carbohydrate synthesis." *The Journal of Organic Chemistry* **76**(6): 1918-1921.
- Davis, B. G. (2004). "Biochemistry. Mimicking posttranslational modifications of proteins." *Science* **303**(5657): 480-482.
- de La Fuente, J. M., A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Canada, A. Fernandez and S. Penades (2001). "Gold Glyconanoparticles as Water-Soluble Polyvalent Models To Study Carbohydrate Interactions This work was supported by the DGICYT (PB96-0820), J.M.F. thanks the MEC for a predoctoral fellowship. A.G.B. thanks CSIC for financial support. We thank Prof. Martin-Lomas for his scientific and financial support." *Angew Chem Int Ed Engl* **40**(12): 2257-2261.
- De Simone, J. M. (2002). "Practical Approaches to Green Solvents." *Science* **297**(5582): 799-803.
- Debono, M., K. E. Merkel, R. M. Molloy, M. Barnhart, E. Presti, A. H. Hunt and R. L. Hamill (1984). "Actaplanin, new glycopeptide antibiotics produced by *Actinoplanes missouriensis*. The isolation and preliminary chemical characterization of actaplanin." *J Antibiot* **37**(2): 85-95.
- Demirjian, D. C., F. Moris-Varas and C. S. Cassidy (2001). "Enzymes from extremophiles." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**(2): 144-151.

- Den Tandt, W. R. (1987). "Human leukocyte and plasma beta-D-fucosidase: identity with beta-D-galactosidase." Biochemical medicine and metabolic biology **38**(3): 331-337.
- Dion, M., L. Fourage, J. N. Hallet and B. Colas (1999). "Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme." Glycoconj. J. **16**(1): 27-37.
- Drone, J., H. Y. Feng, C. Tellier, L. Hoffmann, V. Tran, C. Rabiller and M. Dion (2005). "*Thermus thermophilus* glycosynthases for the efficient synthesis of galactosyl and glucosyl β -(1 \rightarrow 3)-glycosides." European Journal of Organic Chemistry(10): 1977-1983.
- Dube, D. H. and C. R. Bertozzi (2005). "Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics." Nat. Rev. Drug. Discov. **4**(6): 477-488.
- Dudziak, G., Zeng, S., Berger, E. G., Gutierrez Gallego, R., Kamerling, J. P., Kragl, U., Wandrey, C. (1998). "In situ generated O-glycan Core 1 structure as substrate for Gal(β 1-3)GalNAc β -1,6-GlcNAc transferase." Bioorg Med Chem Lett **8**: 2595-2598.
- Dupont, J. and P. A. Z. Suarez (2006). "Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids." Phys. Chem. Chem. Phys. **8**(21): 2441-2452.
- Duverger, E., N. Frison, A. C. Roche and M. Monsigny (2003). "Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance." Biochimie **85**(1-2): 167-179.
- Duverger, E., Frison, N., Roche, A-C., Monsigny, M. (2003). "Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance." Biochimie **85**: 167-179.
- Dwek, R. A. (1996). "Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars." Chem. Rev. **96**(2): 683-720.
- Dzyuba, S. V. and R. A. Bartsch (2002). "Expanding the polarity range of ionic liquids." Tetrahedron Letters **43**(26): 4657-4659.
- Earle, M. J., J. M. S. S. Esperanca, M. A. Gilea, J. N. Canongia Lopes, L. P. N. Rebelo, J. W. Magee, K. R. Seddon and J. A. Widegren (2006). "The distillation and volatility of ionic liquids." Nature **439**(7078): 831-834.
- Earle, M. J. and K. R. Seddon (2002). Ionic liquids: green solvents for the future. Clean Solvents. Washington, DC, American Chemical Society: 10-25.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res. **32**(5): 1792-1797.
- Edgar, R. C. (2010). "Quality measures for protein alignment benchmarks." Nucleic Acids Res. **38**(7): 2145-2153.
- Egorova, K. and G. Antranikian (2005). "Industrial relevance of thermophilic archaea." Curr. Opin. Microbiol. **8**(6): 649-655.
- Ehrlich, P. H. (1979). "The effect of multivalency on the specificity of protein and cell interactions." J Theor Biol **81**(1): 123-127.
- Elling, L., Zervosen, A., Gutiérrez Gallego, R., Nieder, V., Malissard, M., Berger, E. G., Vliegthart, J. F. G., Kamerling, J. P. (1999). "UDP-N-Acetyl- α -D-glucosamine as acceptor substrate of β -1,4-galactosyltransferase. Enzymatic synthesis of UDP-N-acetylglucosamine." Glycoconjugate J **16**: 327-336.

- Eswar, N., B. John, N. Mirkovic, A. Fiser, V. A. Ilyin, U. Pieper, A. C. Stuart, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, B. Yerkovich and A. Sali (2003). "Tools for comparative protein structure modeling and analysis." Nucleic Acids Res. **31**(13): 3375-3380.
- Faber, K. (2004). Biotransformations in organic chemistry. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- Faijes, M. and A. Planas (2007). "In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases." Carbohydr. Res. **342**(12-13): 1581-1594.
- Faijes, M., M. Saura-Valls, X. Pérez, M. Conti and A. Planas (2006). "Acceptor-dependent regioselectivity of glycosynthase reactions by *Streptomyces* E383A β -glucosidase." Carb. Res. **341**(12): 2055-2065.
- Fan, J., J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu and D. Zhao (2003). "Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies." Chem. Commun.(17).
- Fernández-González, A., J. Rychłowska, R. Badía and R. Salzer (2007). "SPR imaging as a tool for detecting mucin – anti-mucin interaction. Outline of the development of a sensor for near-patient testing for mucin." Microchim. Acta **158**(3): 219-225.
- Ferri, S., K. Kojima and K. Sode (2011). "Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes." J Diabetes Sci Technol **5**(5): 1068-1076.
- Fojan, P., P. H. Jonson, M. T. N. Petersen and S. B. Petersen (2000). "What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach." Biochimie **82**(11): 1033-1041.
- Fotin, A., Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen and T. Walz (2004). "Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy." Nature **432**(7017): 573-579.
- Fourage, L., M. Helbert, P. Nicolet and B. Colas (1999). "Temperature Dependence of the Ultraviolet-Visible Spectra of Ionized and Un-ionized Forms of Nitrophenol: Consequence for the Determination of Enzymatic Activities Using Nitrophenyl Derivatives. A Warning." Anal.Biochem. **270**(1): 184-185.
- Fox, D. M., W. H. Awad, J. W. Gilman, P. H. Maupin, H. C. De Long and P. C. Trulove (2003). "Flammability, thermal stability, and phase change characteristics of several trialkylimidazolium salts." Green Chem. **5**(6).
- Fredlake, C. P., J. M. Crosthwaite, D. G. Hert, S. N. V. K. Aki and J. F. Brennecke (2004). "Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids." Journal of Chemical & Engineering Data **49**(4): 954-964.
- Fujimoto, H., M. Miyasato, Y. Ito, T. Sasaki and K. Ajisaka (1998). "Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*." Glycoconj. J. **15**(2): 155-160.
- Fukase, K., T. Yasukochi, Y. Nakai and S. Kusumoto (1996). "*p*-Nitrophenyl group for anomeric protection of oligosaccharides, selective oxidative cleavage via *p*-acetamidophenyl glycosides." Tetrahedron Letters **37**(19): 3343-3344.

- Fuller, J., R. T. Carlin and R. A. Osteryoung (1997). "The room temperature ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate: electrochemical couples and physical properties." Journal of The Electrochemical Society **144**(11): 3881-3886.
- Galínski, M., A. Lewandowski and I. Stepniak (2006). "Ionic liquids as electrolytes." Electrochimica Acta **51**(26): 5567-5580.
- Gambert, U., R. G. Lio, E. Farkas, J. Thiem, V. V. Bencomo and A. Liptak (1997). "Galactosylation with β -galactosidase from bovine testes employing modified acceptor substrates." Bioorg. Med. Chem. **5**(7): 1285-1291.
- Gambert, U. and J. Thiem (1997). "Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant." Carbohydr. Res. **299**(1-2): 85-89.
- Gandolfi, R., S. Jovetic, F. Marinelli and F. Molinari (2007). "Biotransformations of lipoglycopeptides to obtain novel antibiotics." Journal of Antibiotics **60**(4): 265-271.
- García, J. I., H. García-Marín, J. A. Mayoral and P. Pérez (2010). "Green solvents from glycerol. Synthesis and physico-chemical properties of alkyl glycerol ethers." Green Chem. **12**: 426-434.
- García, M. T., Gathergood, N., Scammells, P.J., (2005). "Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology." Green Chem. **7**: 9-14.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; . The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press: pp. 571-607
- Gathergood, N., M. T. Garcia and P. J. Scammells (2004). "Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation " Green Chem. **6**: 166-175.
- Gerhard, U., J. P. Mackay, R. A. Maplestone and D. H. Williams (1993). "The Role of the Sugar and Chlorine Substituents in the Dimerization of Vancomycin Antibiotics." Journal of the American Chemical Society **115**(1): 232-237.
- Ghazi, I., A. G. De Segura, L. Fernández-Arrojo, M. Alcalde, M. Yates, M. L. Rojas-Cervantes, F. J. Plou and A. Ballesteros (2005). "Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides." J. Mol. Cat. B: Enz. **35**(1-3): 19-27.
- Gijsen, H. J. M., L. Qiao, W. Fitz and C. H. Wong (1996). "Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics." Chem. Rev. **96**(1): 443-473.
- Giordano, A., G. Andreotti, A. Tramice and A. Trincone (2006). "Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides." Biotechnol. J. **1**(5): 511-530.
- Goldstein, B. P., G. Candiani, T. M. Arain, G. Romano, I. Ciciliato, M. Berti, M. Abbondi, R. Scotti, M. Mainini, F. Ripamonti, A. Resconi and M. Denaro (1995). "Antimicrobial Activity of Mdl-63,246, a New Semisynthetic Glycopeptide Antibiotic." Antimicrob Agents Ch **39**(7): 1580-1588.

- Goldstein, B. P., E. Selva, L. Gastaldo, M. Berti, R. Pallanza, F. Ripamonti, P. Ferrari, M. Denaro, V. Arioli and G. Cassani (1987). "A40926, a New Glycopeptide Antibiotic with Anti-Neisseria Activity." Antimicrob Agents Ch **31**(12): 1961-1966.
- Goldstein, J., G. Siviglia, R. Hurst, L. Lenny and L. Reich (1982). "Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B, and O individuals." Science **215**(4529): 168-170.
- Gonzalez Lio, R. and J. Thiem (1999). "Chemoenzymatic synthesis of spacer-linked oligosaccharides for the preparation of neoglycoproteins." Carbohydr. Res. **317**(1-4): 180-190.
- Gotor-Fernández, V., E. Busto and V. Gotor (2006). "*Candida antarctica* Lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds." Advanced Synthesis & Catalysis **348**(7-8): 797-812.
- Gottschalk, A. (1960). The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances, Cambridge University Press.
- Guisán, J. M. (1988). "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes." Enzym. Microb. Tech. **10**: 375-382.
- Gupta, M., M. Kapoor, A. B. Majumder and V. Singh (2011). "Isozymes, moonlighting proteins and promiscuous enzymes." Curr. Sci. **100**: 1152-1162.
- Gupta R Fau - Beg, Q. K., P. Beg Qk Fau - Lorenz and P. Lorenz (2002). "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications." Applied Microbiology and Biotechnology **59**(1): 15-32.
- Gutiérrez Gallego, R., Dudziak, G., Kragl, U., Wandrey, C., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G. (2003). "Enzymatic synthesis of the core-2 sialyl Lewis X O-glycan on the tumor-associated MUC1a' peptide." Biochimie **85**: 275-286.
- Hagiwara, R. and Y. Ito (2000). "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions." Journal of Fluorine Chemistry **105**(2): 221-227.
- Hakala, T. K., T. Liitia and A. Suurnakki (2013). "Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp." Carbohydr Polym **93**(1): 102-108.
- Hakomori, S. (2001). "Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines." Adv Exp Med Biol **491**: 369-402.
- Hamill RL, H. M., Stark WS (Lilly) (1973). Antibiotic A477 and process for preparation thereof. United States, Eli Lilly and CO,US.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Haselhorst, T., Weimar, T., Peters, T. (2001). "Molecular recognition of sialyl Lewis^x and related saccharides by two lectins." Journal of the American Chemical Society **123**(43): 10705-10714.

- Hata, D. J. and D. S. Smith (2004). "Blood group B degrading activity of *Ruminococcus gnavus* alpha-galactosidase." Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol **32**(2): 263-274.
- He, N., D. Yi and W.-D. Fessner (2011). "Flexibility of Substrate Binding of Cytosine-5'-Monophosphate-N-Acetylneuraminate Synthetase (CMP-Sialate Synthetase) from *Neisseria meningitidis*: An Enabling Catalyst for the Synthesis of Neo-sialoconjugates." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(13): 2384-2398.
- He, T., K. Li, M. Y. Wu, X. W. Feng, N. Wang, H. Y. Wang, C. Li and X. Q. Yu (2010). "Utilization of biocatalytic promiscuity for direct Mannich reaction." J. Mol. Cat. B: Enz. **67**: 189-194.
- Hedbys, L., E. Johansson, K. Mosbach, P. O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson and H. Lonn (1989). "Synthesis of gal-beta-1-3-glcNac and gal-beta-1-3-glcNAc-set by an enzymatic method comprising the sequential use of beta-galactosidases from *Bovine testes* and *Escherichia coli* " Glycoconj. J. **6**(2): 161-168.
- Hedstrom, L. (2002). "Serine protease mechanism and specificity." Chem Rev **102**(12): 4501-4524.
- Heimburg-Molinaro, J., M. Lum, G. Vijay, M. Jain, A. Almogren and K. Rittenhouse-Olson (2011). "Cancer vaccines and carbohydrate epitopes." Vaccine **29**(48): 8802-8826.
- Henrissat, B., Davies, G. (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases." Curr Opin Struct Biol **7**: 637-644.
- Hernaiz, M. J., A. R. Alcántara, J. I. García and J. V. Sinisterra (2010). "Applied biotransformations in green solvents." Chemistry - A European Journal **16**: 9422-9437.
- Hernaiz, M. J. and D. H. G. Crout (2000). "A highly selective synthesis of *N*-acetylglucosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*." J. Mol. Catal. B: Enzym. **10**(4): 403-408.
- Hernaiz, M. J. and D. H. G. Crout (2000). "Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*." Enzym. Microbiol. Tech. **27**(1-2): 26-32.
- Herrmann, G. F., Elling, L., Krezdorn, C. H., Kleene, R., Berger, E. G., Wandrey, C. (1995). "Use of transformed whole yeast cells expressing β -1,4-galactosyltransferase for the synthesis of *N*-Acetylglucosamine." Bioorg Med Chem Lett **5**(7): 673-676.
- Hess, B., C. Kutzner, D. Van Der Spoel and E. Lindahl (2008). "GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation." J. Chem. Theory & Comput. **4**(3): 435-447.
- Hestrin, S., D. S. Feingold and M. Schramm (1995). β -Glucosidase from sweet almond emulsin. . Methods in enzymology. . S. P. Colowick and N. O. Kaplan. New York . Academic Press: 234-240.
- Hidaka, M., S. Fushinobu, Y. Honda, T. Wakagi, H. Shoun and M. Kitaoka (2010). "Structural explanation for the acquisition of glycosynthase activity." Journal of Biochemistry **147**(2): 237-244.

- Hidaka, M., S. Fushinobu, N. Ohtsu, H. Motoshima, H. Matsuzawa, H. Shoun and T. Wakagi (2002). "Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose." J. Mol. Biol. **322**(1): 79-91.
- Hinou, H. and S. I. Nishimura (2009). "Mechanism-based probing, characterization, and inhibitor design of glycosidases and glycosyltransferases." Curr. Top. Med. Chem. **9**(1): 106-116.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng and S. Mitaku (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins." Bioinformatics **14**(4): 378-379.
- Hirschbein, B. L., Mazenod, F. P., Whitesides, G. M. (1982). "Synthesis of phosphoenolpyruvate and its use in adenosine triphosphate cofactor regeneration." J Org Chem **47**: 3765-3766.
- Hobbs, H. R., H. M. Kirke, M. Poliakoff and N. R. Thomas (2007). "Homogeneous biocatalysis in both fluorous biphasic and supercritical carbon dioxide systems." Angew. Chem. Int. Ed. **46**: 7860-7863.
- Hobbs, H. R. and N. R. Thomas (2007). "Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorous solvents, and under solvent-free conditions." Chem. Rev. **107**(6): 2786-2820.
- Hoh, C., Dudziak, G., Liese, A. (2002). "Optimization of the Enzymatic Synthesis of O-Glycan Core 2 Structure by Use of a Genetic Algorithm." Bioorg Med Chem Lett **12**: 1031-1034.
- Holeman, A. and P. H. Seeberger (2004). "Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates." Curr. Opin. Biotechnol. **15**(6): 615-622.
- Hölemann, A., Seeberger, P.H. (2004). "Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates." Curr Opin Biotech **15**: 615-622.
- Hommalai, G., S. G. Withers, W. Chuenchor, J. R. K. Cairns and J. Svasti (2007). "Enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides by rice β -glucosidase glycosynthase mutants." Glycobiology **17**(7): 744-753.
- Homola, J. (2003). "Present and future of surface plasmon resonance biosensors." Analytical and Bioanalytical Chemistry **377**(3): 528-539.
- Homola, J. (2008). "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological Species." Chem. Rev. **108**(2): 462-493.
- Honda, Y. and M. Kitaoka (2006). "The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase." J Biol Chem **281**(3): 1426-1431.
- Horváth, I. T. (2005). Multiphase Homogeneous Catalysis. Weinheim Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Horvath, I. T., Anastas, P. T. (2007). "Innovations and green chemistry." Chem. Rev. **107**(6): 2169-2173.
- Horváth, I. T. and J. Rábai (1994). "Facile catalyst separation without water: fluorous biphasic hydroformylation of olefins." Science **266**(5182): 72-75.

- Houseman, B. and M. Mrksich (2002). Model Systems for Studying Polyvalent Carbohydrate Binding Interactions. Host-Guest Chemistry. S. Penadés, Springer Berlin Heidelberg. **218**: 1-44.
- Houseman, B. T., Mrksich, M. (2002). "Model systems for studying polyvalent carbohydrate binding interactions." Top Curr Chem **218**: 1-44.
- Hovius, R., P. Vallotton, T. Wohland and H. Vogel (2000). "Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions." Trends Pharmacol. Sci. **21**: 266-273.
- Hsing, W. and E. Canale-Parola (1992). "Cellobiose chemotaxis by the cellulolytic bacterium *Cellulomonas gelida*." J Bacteriol **174**(24): 7996-8002.
- Huber, R., T. Langworthy, H. König, M. Thomm, C. Woese, U. Sleytr and K. Stetter (1986). "Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C." Archives of Microbiology **144**(4): 324-333.
- Hult, K. and P. Berglund (2007). "Enzyme promiscuity: mechanism and applications." Trends Biotechnol. **25**(5): 231-238.
- Hurtado-Gómez, E., O. Abián, F. J. Muñoz, M. J. Hernáiz, A. Velázquez-Campoy and J. L. Neira (2008). "Defining the epitope region of a peptide from the *Streptomyces coelicolor* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system able to bind to the enzyme I." Biophysical J. **95**(3): 1336-1348.
- Imberty, A. and A. Varrot (2008). "Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates." Curr. Opin. Struct. Biol. **18**: 567-576.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
- Ito, S., T. Kobayashi, K. Ara, K. Ozaki, S. Kawai and Y. Hatada (1998). "Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures." Extremophiles **2**(3): 185-190.
- Ito, Y. and T. Sasaki (1997). "Cloning and Characterization of the Gene Encoding a Novel β -Galactosidase from *Bacillus circulans*." Bios. Biotech. Biochem. **61**(8): 1270-1276.
- Jahn, M., D. Stoll, R. A. Warren, L. Szabo, P. Singh, H. J. Gilbert, V. M. Ducros, G. J. Davies and S. G. Withers (2003). "Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides." Chem Commun (Camb)(12): 1327-1329.
- Jain, A. and H. S. Ashbaugh (2011). "Helix stabilization of poly(ethylene glycol)-peptide conjugates." Biomacromolecules **12**(7): 2729-2734.
- James, R. C., J. G. Pierce, A. Okano, J. Xie and D. L. Boger (2012). "Redesign of Glycopeptide Antibiotics: Back to the Future." Acs Chemical Biology **7**(5): 797-804.
- Janssen, C. L., I. B. Nielsen, M. L. Leininger, E. F. Valeev and E. T. Seidl (2004). "The Massively Parallel Quantum Chemistry Program (MPQC), version 2.3. 1." Sandia National Laboratories: Livermore, CA, USA.
- Jastorff, B., R. Störmann, J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nüchter, B. Ondruschka and J. Filser (2003). "How hazardous are ionic liquids? Structure - activity relationships and

- biological testing as important elements for sustainability evaluation." Green Chem. **5**: 136-142.
- Jencks, W. P. (1975). "Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **43**: 219-410.
- Jessop, P. G., S. Trakhtenberg and J. Warner (2008). The twelve principles of green chemistry. Innovations in Industrial and Engineering Chemistry. Washington, DC, American Chemical Society: 401-436.
- Jiménez-Barbero, J., Peters, T., Ed. (2003). NMR spectroscopy of glycoconjugates. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Jovetic, S., Y. Zhu, G. L. Marcone, F. Marinelli and J. Tramper (2010). "β-Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense?" Trends in Biotechnology **28**(12): 596-604.
- Juers, D. H., T. D. Heightman, A. Vasella, J. D. McCarter, L. Mackenzie, S. G. Withers and B. W. Matthews (2001). "A structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ) β-galactosidase." Biochem. **40**(49): 14781-14794.
- Kaar, J. L., A. M. Jesionowski, J. A. Berberich, R. Moulton and A. J. Russell (2003). "Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability." J. Am. Chem. Soc. **125**(14): 4125-4131.
- Kaftzik, N., P. Wasserscheid and U. Kragl (2002). "Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the β-galactosidase catalysed synthesis of *N*-acetylglucosamine." Organic Process Research & Development **6**(4): 553-557.
- Kahne, D., C. Leimkuhler, L. Wei and C. Walsh (2005). "Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics." Chemical Reviews **105**(2): 425-448.
- Kahsay, R. Y., G. Gao and L. Liao (2005). "An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes." Bioinformatics **21**(9): 1853-1858.
- Kalf, G. F. and S. V. Rieder (1958). "The purification and properties of trehalase." J Biol Chem **230**(2): 691-698.
- Kapoor, M. and M. N. Gupta (2012). "Lipase Promiscuity and its biochemical applications." Process Biochem.(0).
- Karamanska, R., J. Clarke, O. Blixt, J. MacRae, J. Zhang, P. Crocker, N. Laurent, A. Wright, S. Flitsch, D. Russell and R. Field (2008). "Surface plasmon resonance imaging for real-time, label-free analysis of protein interactions with carbohydrate microarrays." Glycoconjugate Journal **25**(1): 69-74.
- Karlsson, R. (2004). "SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas." Journal of Molecular Recognition **17**(3): 151-161.
- Karnaouri, A., E. Topakas, T. Paschos, I. Taouki and P. Christakopoulos (2013). "Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 beta-glucosidase from *Myceliophthora thermophila*." Peerj **26**(1).
- Katchalski-Katzir, E. and D. M. Kraemer (2000). "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential." J. Mol. Cat. B: Enz. **10**(1-3): 157-176.
- Kaupp, G. (2003). "Solvent-free Organic Synthesis. By Koichi Tanaka." Angewandte Chemie International Edition **42**(40): 4851-4852.

- Keilin, D. and E. F. Hartree (1948). "The use of glucose oxidase (notatin) for the determination of glucose in biological material and for the study of glucose-producing systems by manometric methods." Biochem J **42**(2): 230-238.
- Khare, D. P., O. Hindsgaul and R. U. Lemieux (1985). "The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-N-biose I and N-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of α -L-fucosyl transferases." Carbohydrate Research **136**(0): 285-308.
- Khmelnitsky, Y. L., V. V. Mozhaev, A. B. Belova, M. V. Sergeeva and K. Martinek (1991). "Denaturation capacity-a new quantitative criterion for selection of organic-solvents as reaction media in biocatalysis " Eur. J. Biochem. **198**(1): 31-41.
- Kiessling, L. L., Cairo, C.W. (2002). "Hitting the sweet spot." Nat Biotech **20**: 234-235.
- Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E., Strong, L. E. (2000). "Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions." Curr Opin Chem Biol **4**: 696-703.
- Kikkeri, R., D. Grunstein and P. H. Seeberger (2010). "Lectin biosensing using digital analysis of Ru(II)-glycodendrimers." J Am Chem Soc **132**(30): 10230-10232.
- Kilaru, P., G. A. Baker and P. Scovazzo (2007). "Density and surface tension measurements of imidazolium quaternary phosphonium, and ammonium based room temperature ionic liquids: Data and correlations." Journal of Chemical & Engineering Data **52**(6): 2306-2314.
- Kim, A., J. L. Kuti and D. P. Nicolau (2007). "Review of dalbavancin, a novel semisynthetic lipoglycopeptide." Expert Opin Investig Drugs **16**(5): 717-733.
- Kim, Y. W., H. M. Chen, J. H. Kim, J. Mullegger, D. Mahuran and S. G. Withers (2007). "Thioglycoligase-based assembly of thiodisaccharides: screening as beta-galactosidase inhibitors." Chembiochem **8**(13): 1495-1499.
- Klein, J., R. Meinecke, M. Mayer and B. Meyer (1999). "Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR." Journal of the American Chemical Society **121**(22): 5336-5337.
- Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M., Meyer, B. (1999). "Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR." Journal of the American Chemical Society **121**: 5336-5337.
- Klibanov, A. M. (1983). "Immobilized enzymes and cells as practical catalysts." Science **219**(4585): 722-727.
- Knezevic, Z., N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic and R. Prodanovic (2006). "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment." Biochemical Engineering Journal **30**(3): 269-278.
- Koeller, K. M., Smith, M. E. B., Wong, C-H. (2000). "Chemoenzymatic synthesis of PSGL-1 glycopeptides: Sulfation on tyrosine affects glycosyltransferase-catalyzed synthesis of the O-glycan." Bioorg Med Chem **8**: 1017-1025.
- Koeller, K. M. and C. H. Wong (2000). "Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies." Chem. Rev. **100**(12): 4465-4493.

- Kogelberg, H., Solis, D., Jiménez-Barbero, J. (2003). "New structural insights into carbohydrate-protein interactions from NMR spectroscopy." Current Opinion in Structural Biology **13**: 1-8.
- Koilpillai, L., R. A. Gadre, S. Bhatnagar, R. C. Raman, S. Ponrathnam, K. K. Kumar, G. R. Ambekar and J. G. Shewale (1990). "Immobilization of penicillin G acylase on methacrylate polymers." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **49**(2): 173-182.
- Kolb, H. C., M. G. Finn and K. B. Sharpless (2001). "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." Angew Chem Int Ed Engl **40**(11): 2004-2021.
- Kosmulski, M., J. Gustafsson and J. B. Rosenholm (2004). "Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited." Thermochim. Acta **412**(1-2): 47-53.
- Kragl, U., M. Eckstein and N. Kaftzik (2002). "Enzyme catalysis in ionic liquids." Curr. Opin. Biotechnol. **13**(6): 565-571.
- Krishnamurthy, V. M., L. A. Estroff and G. M. Whitesides (2006). Multivalency in Ligand Design. Fragment-based Approaches in Drug Discovery, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 11-53.
- Kumar, A. (2008). "Estimates of internal pressure and molar refraction of imidazolium based ionic liquids as a function of temperature." Journal of Solution Chemistry **37**(2): 203-214.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lahiri, J., L. Isaacs, J. Tien and G. M. Whitesides (1999). "A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: A surface plasmon resonance study." Analytical Chemistry **71**(4): 777-790.
- Lamb, S. B. and D. C. Stuckey (2000). "Enzyme immobilization on colloidal liquid aphrons (CLAs): the influence of system parameters on activity." Enzym. Microb. Tech. **26**(8): 574-581.
- Lang, M., T. Kamrat and B. Nidetzky (2006). "Influence of ionic liquid cosolvent on transgalactosylation reactions catalyzed by thermostable β -glycosylhydrolase celB from *Pyrococcus furiosus*." Biotech. Bioeng. **95**(6): 1093 - 1100.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss and J. M. Thornton (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." Journal of Applied Crystallography **26**(2): 283-291.
- Lee, C. C., J. A. MacKay, J.M. Frechet and F. C. Szoka (2005). "Designing dendrimers for biological applications." Nat Biotechnol **23**(12): 1517-1526.
- Lee, S. H. (2005). Biocatalysis in ionic liquids: Influence of physicochemical properties of ionic liquids on enzyme activity and enantioselectivity; *citado por Cho y col. 2012*. Pohang, Korea. , Pohang University of Science and Technology.
- Lemieux, R. U. and H. Driguez (1975). "Chemical synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-D-glucose. Lewis a blood-group antigenic determinant." J. Am. Chem. Soc. **97**(14): 4063-4069.

- Leuschner, C. and G. Antranikian (1995). "Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms." World Journal of Microbiology and Biotechnology **11**(1): 95-114.
- Levitsky, V. Y., P. Lozano and J. L. Iborra (1999). "Kinetic analysis of deactivation of immobilized α -chymotrypsin by watermiscible organic solvent in kyotorphin synthesis. ." Biotechnol. Bioeng. **65**: 170-175.
- Li, C., X. W. Feng, N. Wang, Y. J. Zhou and X. Q. Yu (2008). "Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction." Green Chem. **10**: 616-618.
- Li, K., T. He, C. Li, X. W. Feng, N. Wang and X. Q. Yu (2009). "Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: utilization of biocatalytic promiscuity for C-C bond formation in a "one pot" synthesis." Green Chem. **11**: 777-779.
- Li, T.-L., Y.-C. Liu and S.-Y. Lyu (2012). "Combining biocatalysis and chemoselective chemistries for glycopeptide antibiotics modification." Current Opinion in Chemical Biology **16**(1-2): 170-178.
- Li, W., X. Xiang, S. Tang, B. Hu, L. Tian, Y. Sun, H. Ye and X. Zeng (2009). "Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by β -d-Galactosidase from *Bacillus circulans*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(9): 3927-3933.
- Li, W. F., X. X. Zhou and P. Lu (2005). "Structural features of thermozymes." Biotechnol. Adv. **23**(4): 271-281.
- Li, Y. and X. Chen (2012). "Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications." Appl Microbiol Biotechnol **94**(4): 887-905.
- Li, Z., R. J. Willke, L. A. Pinto, B. E. Rittenhouse, M. J. Rybak, A. M. Pleil, C. W. Crouch, B. Hafkin and H. A. Glick (2001). "Comparison of length of hospital stay for patients with known or suspected methicillin-resistant *Staphylococcus* species infections treated with linezolid or vancomycin: a randomized, multicenter trial." Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy **21**(3): 263-274.
- Liese, A., K. Seelbach and C. Wandrey (2000). Industrial biotransformations, Weinheim: Wiley/VCH, 2000.
- Lingwood, C. A. (1998). "Oligosaccharide receptors for bacteria: a view to a kill." Curr. Opin. Chem. Biol. **2**(6): 695-700.
- Linman, M. J., J. D. Taylor, H. Yu, X. Chen and Q. Cheng (2008). "Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides." Anal. Biochem. **80**(11): 4007-4013.
- Liu, Q., M. H. A. Janssen, F. V. Rantwijk and R. A. Sheldon (2005). "Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations " Green Chem. **7**: 39-42.
- Lu, J. and P. H. Toy (2009). "Organic polymer supports for synthesis and for reagent and catalyst immobilization." Chem. Rev. **109**(2): 815-838.
- Luckarift, H. R., J. C. Spain, R. R. Naik and M. O. Stone (2004). "Enzyme immobilization in a biomimetic silica support." Nat. Biotech. **22**(2): 211-213.
- Lundquist, J. J., S. D. Debenham and E. J. Toone (2000). "Multivalency effects in protein--carbohydrate interaction: the binding of the Shiga-like toxin 1

- binding subunit to multivalent C-linked glycopeptides." J Org Chem **65**(24): 8245-8250.
- M. A. van Wageningen, A., T. Staroske and D. H. Williams (1998). "Binding of D-serine-terminating cell-wall analogues to glycopeptide antibiotics." Chemical Communications **0**(11): 1171-1172.
- Mackay, J. P., U. Gerhard, D. A. Beauregard, R. A. Maplestone and D. H. Williams (1994). "Dissection of the Contributions toward Dimerization of Glycopeptide Antibiotics." Journal of the American Chemical Society **116**(11): 4573-4580.
- Mackay, J. P., U. Gerhard, D. A. Beauregard, M. S. Westwell, M. S. Searle and D. H. Williams (1994). "Glycopeptide Antibiotic-Activity and the Possible Role of Dimerization - a Model for Biological Signaling." Journal of the American Chemical Society **116**(11): 4581-4590.
- Mackenzie, L. F., Q. Wang, R. A. J. Warren and S. G. Withers (1998). "Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis." Journal of the American Chemical Society **120**(22): 5583-5584.
- Madeira Lau, R., F. van Rantwijk, K. R. Seddon and R. A. Sheldon (2000). "Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids." Org. Lett. **2**(26): 4189-4191.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker (2003). Brock biology of microorganisms, Prentice Hall/Pearson Education.
- Maffioli, S. I., R. Ciabatti, G. Romano, E. Marzorati, M. Preobrazhenskaya and A. Pavlov (2005). "Synthesis and antibacterial activity of alkyl derivatives of the glycopeptide antibiotic A40926 and their amides." Bioorg Med Chem Lett **15**(16): 3801-3805.
- Majumder, A. B., B. Singh and M. N. Gupta (2008). "Diastereoselective synthesis of (R)-(alkyl)- β -D-galactopyranoside by using β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in low-water media." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(1): 124-128.
- Malabarba, A. and R. Ciabatti (2001). "Glycopeptide derivatives." Current Medicinal Chemistry **8**(14): 1759-1773.
- Malabarba, A., R. Ciabatti, R. Scotti, B. P. Goldstein, P. Ferrari, M. Kurz, B. P. Andreini and M. Denaro (1995). "New semisynthetic glycopeptides MDL 63,246 and MDL 63,042, and other amide derivatives of antibiotic A-40,926 active against highly glycopeptide-resistant VanA enterococci." J Antibiot **48**(8): 869-883.
- Malabarba, A. and B. P. Goldstein (2005). "Origin, structure, and activity in vitro and in vivo of dalbavancin." J Antimicrob Chemother **55**(2): ii15-20.
- Malabarba, A., T. I. Nicas and R. C. Thompson (1997). "Structural modifications of glycopeptide antibiotics." Medicinal Research Reviews **17**(1): 69-137.
- Malet, C. and A. Planas (1998). "From beta-glucanase to beta-glucansynthase: glycosyl transfer to alpha-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile." FEBS Lett **440**(1-2): 208-212.
- Malykh, Y. N., R. Schauer and L. Shaw (2001). "N-Glycolylneuraminic acid in human tumours." Biochimie **83**(7): 623-634.

- Mammen, M., Choi, S-K., Whitesides, G. M. (1998). "Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors." Angew Chem Int Ed **37**: 2754-2794.
- Mandal, P. K. and W. B. Turnbull (2010). "Studies on the synthesis of Lewis-y oligosaccharides." Carbohydr. Res. **346**(14): 2113-2120.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Martin, M. J., J. C. Rayner, P. Gagneux, J. W. Barnwell and A. Varki (2005). "Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(36): 12819-12824.
- Mateo, C., O. Abian, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan (2000). "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites." Biotech. Bioeng. **68**(1): 98-105.
- Mateo, C., O. Abian, G. Fernández-Lorente, J. Pedroche, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisan (2002). "Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment." Biotechnology Progress **18**(3): 629-634.
- Mateo, C., J. M. Bolivar, C. A. Godoy, J. Rocha-Martin, B. C. Pessela, J. A. Curiel, R. Muñoz, J. M. Guisan and G. Fernández-Lorente (2010). "Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports." Biomacromolecules **11**(11): 3112-3117.
- Mateo, C., G. Fernández-Lorente, O. Abian, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2000). "Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage." Biomacromolecules **1**(4): 739-745.
- Mateo, C., V. Grazú, B. C. Pessela, T. Montes, J. M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2007). "Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization." Biochem. Soc. Trans. **35**: 1593-1601.
- Mateo, C., J. M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, B. C. C. Pessela, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2006). "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins." Enzym. Microb. Tech. **39**(2): 274-280.
- Mathews, C. K., K. G. Ahern, K. E. Van Holde and J. M. G. de Buitrago (2003). Biochemistry, Addison Wesley.
- Maugard, T., D. Gaunt, M. D. Legoy and T. Besson (2003). "Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*." Biotechnology Letters **25**(8): 623-629.
- Mayer, C., D. L. Jakeman, M. Mah, G. Karjala, L. Gal, R. A. J. Warren and S. G. Withers (2001). "Directed evolution of new glycosynthases from

- Agrobacterium β -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis." Chemistry & Biology **8**(5): 437-443.
- Mayer, C., D. L. Zechel, S. P. Reid, R. A. Warren and S. G. Withers (2000). "The E358S mutant of Agrobacterium sp. beta-glucosidase is a greatly improved glycosynthase." FEBS Lett **466**(1): 40-44.
- Mayer, M., Meyer, B. (1999). "Characterization of ligand binding by Saturation Transfer Difference NMR spectroscopy." Angewandte Chemie Int. Ed. **38**: 1784-1788.
- Mayer, M., Meyer, B. (2001). "Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor." Journal of the American Chemical Society **123**(25): 6108-6117.
- McIntosh, L. P., G. Hand, P. E. Johnson, M. D. Joshi, M. Korner, L. A. Plesniak, L. Ziser, W. W. Wakarchuk and S. G. Withers (1996). "The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a ^{13}C -NMR study of bacillus circulans xylanase." Biochemistry **35**(31): 9958-9966.
- Meinecke, R. and B. Meyer (2001). "Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$." Journal of Medicinal Chemistry **44**(19): 3059-3065.
- Melgar, M. J., J. A. Cabezas and P. Calvo (1985). "Kinetic studies on β -d-fucosidase of *Littorina littorea* L." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **80**(1): 149-156.
- Meyer, B., Peters, T. (2003). "NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors." Angewandte Chemie Int. Ed. **42**(8): 864-890.
- Michalet, X., S. Weiss and M. Jäger (2006). "Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics." Chem. Rev. **106**(5): 1785-1813.
- Michalik, D., Vliegenthart, J. F. G., Kamerling, J. P. (2002). "Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharide fragments of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14." J Chem Soc, Perkin Transl 1: 1973-1981.
- Miletic, N., R. Rohandi, Z. VukoviÄc, A. Nastasovic and K. Loos (2009). "Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization." Reactive and Functional Polymers **69**(1): 68-75.
- Miletic, N., Z. Vukovic, A. Nastasovic and K. Loos (2009). "Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins: A versatile immobilization supports for biocatalysts." J. Mol. Cat. B: Enz. **56**(4): 196-201.
- Milosavic, N., R. Prodanovic, S. Jovanovic and Z. Vujcic (2007). "Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA)." Enzym. Microb. Tech. **40**(5): 1422-1426.

- Miller, E. S., Jr., Kimberley, N. Parker, W. Liebl, D. Lam, W. Callen, M. A. Snead, E. J. Mathur, J. M. Short and R. M. Kelly (2001). "Alpha-D-galactosidases from *Thermotoga* species." Methods Enzymol **330**: 246-260.
- Miller, J. (1972). Experiments in Molecular Genetics Manual. New York., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mitsunobu, O. (1981). "The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products." Synthesis **1981**(01): 1-28.
- Miyasato, M. and K. Ajisaka (2004). "Regioselectivity in beta-galactosidase-catalyzed transglycosylation for the enzymatic assembly of D-galactosyl-D-mannose." Biosci. Biotechnol. Biochem. **68**(10): 2086-2090.
- Moller, H., N. Serttas, H. Paulsen, J. M. Burchell and J. Taylor-Papadimitriou (2002). "NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3." European Journal of Biochemistry **269**(5): 1444-1455.
- Monzavi-Karbassi, B., G. Cunto-Amesty, P. Luo, S. Shamloo, M. Blaszyk-Thurin and T. Kieber-Emmons (2001). "Immunization with a carbohydrate mimicking peptide augments tumor-specific cellular responses." Int Immunol **13**(11): 1361-1371.
- Moracci, M., A. Trincone, G. Perugino, M. Ciaramella and M. Rossi (1998). "Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles." Biochemistry **37**(49): 17262-17270.
- Moracci, M., A. Trincone and M. Rossi (2001). "Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis." J. Mol. Catal. B. Enzym. **11**(4-6): 155-163.
- Moreno, J. M., M. Arroyo, M. J. Hernáiz and J. V. Sinisterra (1997). "Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*." Enzym. Microb. Tech. **31**: 552-558.
- Moreno, J. M., M. J. Hernáiz, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, M. T. Bustos, M. E. Sanchez and J. F. Bello (1997). "Immobilization of pure lipases A and B from *Candida cylindracea* increase the enantioselectivity and the thermostability." J. Mol. Cat. B: Enz. **2**: 177-184.
- Morère, J., M. J. Tenorio, M. J. Torralvo, C. Pando, J. A. R. Renuncio and A. Cabañas (2011). "Deposition of Pd into mesoporous silica SBA-15 using supercritical carbon dioxide." J. Supercrit. Fluids **56**(2): 213-222.
- Mori, T., M. Li, A. Kobayashi and Y. Okahata (2002). "Reversible control of enzymatic transglycosylations in supercritical fluoroform using a lipid-coated β -D-galactosidase." Journal of the American Chemical Society **124**(7): 1188-1189.
- Morris, G. M., R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." Journal of computational chemistry **30**(16): 2785-2791.

- Mulder, H., Schachter, H., de Jong-Brink, M., van der Ven, J. G., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. (1991). "Identification of a novel UDP-Gal:GalNAc β 1-4GlcNAc-R β 1-3-galactosyltransferase in the connective tissue of the snail *Lymnaea stagnalis*." *Eur J Biochem* **201**: 459-465.
- Munoz, E. M., J. Correa, E. Fernandez-Megia and R. Riguera (2009). "Probing the relevance of lectin clustering for the reliable evaluation of multivalent carbohydrate recognition." *J Am Chem Soc* **131**(49): 17765-17767.
- Munoz, J. F., S. Andre, H.-J. Gabius, J. V. Sinisterra, M. J. Hernaiz and R. J. Linhardt (2009). "Green glycosylation using ionic liquid to prepare alkyl glycosides for studying carbohydrate-protein interactions by SPR." *Green Chem.* **11**(3): 373-379.
- Muñoz, F., A. Rumbero, J. V. Sinisterra, J. Santos, S. André, H. J. Gabius, J. Jiménez-Barbero and M. J. Hernáiz (2008). "Versatile strategy for the synthesis of biotin-labelled glycans, their immobilization to establish a bioactive surface and interaction studies with a lectin on a biochip." *Glycoconjugate Journal* **25**(7): 633-646.
- Muñoz, F. J., J. Pérez, Á. Rumbero, J. I. Santos, F. J. Cañada, S. André, H.-J. Gabius, J. Jiménez-Barbero, J. V. Sinisterra and M. J. Hernaiz (2009). "Glycan tagging to produce bioactive ligands for a surface plasmon resonance (SPR) study via immobilization on different surfaces." *Bioconjugate Chem.* **20**(4): 673-682.
- Muñoz, F. J., J. I. Santos, A. Arda, S. Andre, H.-J. Gabius, J. V. Sinisterra, J. Jimenez-Barbero and M. J. Hernaiz (2010). "Binding studies of adhesion/growth-regulatory galectins with glycoconjugates monitored by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy." *Org. Biomol. Chem* **8**(13): 2986-2992.
- Murata, T., T. Hattori, S. Amarume, A. Koichi and T. Usui (2003). "Kinetic studies on endo- β -galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of *N*-acetyllactosamine-repeating oligosaccharide β -glycosides using its transglycosylation activity." *Eur. J. Biochem.* **270**(18): 3709-3719.
- Murata, T. and T. Usui (2006). "Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(5): 1049-1059.
- Murugesan, S. and R. J. Linhardt (2005). "Ionic Liquids in Carbohydrate Chemistry - Current Trends and Future Directions." *Curr. Org. Chem.* **2**: 437.
- Muthana, S., H. Yu, H. Cao, J. Cheng and X. Chen (2009). "Chemoenzymatic synthesis of a new class of macrocyclic oligosaccharides." *J Org Chem* **74**(8): 2928-2936.
- Myszka, D. G. and R. L. Rich (2000). "Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery." *Pharm. Sci. & Tech. Today* **3**(9): 310-317.
- Nagarajan, R. (1994). *Glycopeptide antibiotics*, Marcel Dekker Incorporated.
- Naundorf, A., M. Caussette and K. Ajisaka (1998). "Characterization of the Immobilized β -Galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of β (1 \rightarrow 3)-linked disaccharides." *Bios. Biotech. Biochem.* **62**(7): 1313-1317.

- Nicolaou, K. C., C. N. C. Boddy, S. Bräse and N. Winssinger (1999). "Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics." Angewandte Chemie International Edition **38**(15): 2096-2152.
- Nicolaou, K. C., Mitchell, H. J. (2001). "Adventures in carbohydrate chemistry: New synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology " Angew Chem Int Ed **40**: 1576-1624.
- Nieder, V., S. P. Marx, R. G. Gallego, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart and L. Elling (2003). "Synthesis of nucleotide-activated disaccharides with β -galactosidase from *Bacillus circulans* and α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*." J. Mol. Catal. B. Enzym. **21**(4-6): 157-166.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kähler and G. Antranikian (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." Appl. Microbiol. Biotech. **51**(6): 711-729.
- Nielsen, M., C. Lundegaard, O. Lund and T. N. Petersen (2010). "CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles." Nucl. Acids Res. **38**(suppl 2): W576-W581.
- Nieto, M. and H. R. Perkins (1971). "Physicochemical Properties of Vancomycin and Iodovancomycin and Their Complexes with Diacetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanine." Biochemical Journal **123**(5): 773-&.
- Niggemann, J., Kamerling, J. P., Vliegthart, F. G. (1998). " β -1,4-Galactosyltransferase-catalyzed synthesis of the branched tetrasaccharide repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* type 14." Bioorg Med Chem **6**: 1605-1612.
- Nitanai, Y., T. Kikuchi, K. Kakoi, S. Hanmaki, I. Fujisawa and K. Aoki (2009). "Crystal Structures of the Complexes between Vancomycin and Cell-Wall Precursor Analogs." Journal of Molecular Biology **385**(5): 1422-1432.
- Nord, C. E. and T. Wadstrom (1972). "Formation of -L- and -D-fucosidase in cultures of *Streptococcus mitis*." Med Microbiol Immunol **158**(2): 95-103.
- Norde, W., F. MacRitchie, G. Nowicka and J. Lykelma (1986). "Protein adsorption at solid-liquid interfaces: reversibility and conformation aspects." J. Colloid Interface Sci. **112**: 447-456.
- Nunoura, N., K. Ohdan, T. Yano, K. Yamamoto and H. Kumagai (1996). "Purification and characterization of beta-D-glucosidase (beta-D-fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to cellobiose." Biosci Biotechnol Biochem **60**(2): 188-193.
- Oliveira, C., P. M. Guimaraes and L. Domingues (2011). "Recombinant microbial systems for improved beta-galactosidase production and biotechnological applications." Biotechnol Adv **29**(6): 600-609.
- Oroz-Guinea, I. and E. García-Junceda "Enzyme catalysed tandem reactions." Current Opinion in Chemical Biology(0).
- Oshima, T. and K. Imahori (1971). "Isolation of an extreme thermophile and thermostability of its transfer ribonucleic acid and ribosomes." Journal of General and Applied Microbiology **17**: 513-517.
- Paiardini, A., G. Gianese, F. Bossa and S. Pascarella (2002). "Structural plasticity of thermophilic serine hydroxymethyltransferases. Extensive comparative study

- of an enzyme family with a focus on the structural features involved in thermostabilization." *Proteins* **50**: 122-134.
- Palcic, M. M., de Heerze, L. D., Pierce, M., Hindsgaul, O. (1988). "The use of hydrophobic synthetic glycosides as acceptors in glycosyltransferase assays." *Glycoconjugate J* **5**: 49-63.
- Palcic, M. M., Hindsgaul, O. (1991). "Flexibility in the donor substrate specificity of β -1,4-galactosyltransferase: application in the synthesis of complex carbohydrates." *Glycobiology* **1**(2): 205-209.
- Palmacci, E., O. Plante, M. Hewitt and P. Seeberger (2003). "Automated synthesis of oligosaccharides." *Helv. Chim. Acta* **86**: 3975-3990.
- Pan, C., B. Hu, W. Li, Y. Sun, H. Ye and X. Zeng (2009). "Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles." *J. Mol. Cat. B: Enz.* **61**(3-4): 208-215.
- Panasik, N., J. E. Brenchley and G. K. Farber (2000). "Distributions of structural features contributing to thermostability in mesophilic and thermophilic α/β barrel glycosyl hydrolases." *Biochim. Biophys. Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology* **1543**(1): 189-201.
- Parenti, F., G. Beretta, M. Berti and V. Arioli (1978). "Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties." *J Antibiot* **31**(4): 276-283.
- Parenti, F., G. C. Schito and P. Courvalin (2000). "Teicoplanin Chemistry and Microbiology." *J Chemother* **5**: 5-14.
- Park, S. and R. J. Kazlauskas (2003). "Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology." *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**(4): 432-437.
- Pattnaik, P. (2005). "Surface Plasmon Resonance: applications in understanding receptor - ligand interaction." *Appl. Biochem. Biotechnol.* **126**: 79-92.
- Paulsen, H. (1982). "Advances in Selective Chemical Syntheses of Complex Oligosaccharides." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21**(3): 155-173.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**(8): 2444-2448.
- Pedroche, J., M. del Mar Yust, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. Girón-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, J. M. Guisán and F. Millán (2007). "Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability." *Enzyme and Microbial Technology* **40**(5): 1160-1166.
- Peng, Z. G., K. Hidajat and M. S. Uddin (2004). "Conformational change of adsorbed and desorbed bovine serum albumin on nano-sized magnetic particles." *Colloids Surf. B* **33**(1): 15-21.
- Pérez-Sánchez, M., Á. Cortés-Cabrera, H. García-Martín, J. V. Sinisterra, J. I. García and M. J. Hernaíz (2011). "Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol." *Tetrahedron* **67**(40): 7708-7712.

- Pérez-Sánchez, M., M. Sandoval, A. Cortés-Cabrera, H. García-Marín, J. V. Sinisterra, J. I. García and M. J. Hernáiz (2011). "Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with Biolacta β -galactosidase." *Green Chem.* **13**: 2810-2817.
- Pérez-Sánchez, M., M. Sandoval and M. J. Hernáiz (2012). "Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase." *Tetrahedron* **68**(9): 2141-2145.
- Pérez, M., J. V. Sinisterra and M. J. Hernáiz (2010). "Hydrolases in green solvent." *Curr. Org. Chem.* **14**(20): 2366-2383.
- Perichon, B. and P. Courvalin (2009). "VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(11): 4580-4587.
- Perugino, G., A. Trincone, M. Rossi and M. Moracci (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." *Trends Biotechnol.* **22**(1): 31-37.
- Pessela, B. C. C., R. Fernández-Lafuente, M. Fuentes, A. Vián, J. L. García, A. V. Carrascosa, C. Mateo and J. M. Guisán (2003). "Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads." *Enzym. Microb. Tech.* **32**(3-4): 369-374.
- Petkar, M., A. Lali, P. Caimi and M. Daminati (2006). "Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis." *J. Mol. Cat. B: Enz.* **39**(1-4): 83-90.
- Plante, O., E. Palmacci and P. Seeberger (2001). "Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides." *Science* **291**: 1523-1527.
- Ponrasu, T., B. Manohar and S. Divakar (2009). "A response surface methodological study on prediction of glucosylation yields of thiamin using immobilized β -glucosidase." *Process Biochem.* **44**(2): 251-255.
- Poole, C. F. (2004). "Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids." *J. Chromatogr. A* **1037**(1-2): 49-82.
- Prajapati, V. D., G. K. Jani and S. M. Khanda (2013). "Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications." *Carbohydr Polym* **95**(1): 540-549.
- Prasad, V., R. R. Kale, V. Kumar and V. K. Tiwari (2010). "Carbohydrate chemistry and room temperature ionic liquids (RTILs): Recent trends, opportunities, challenges and future perspectives." *Curr. Org. Synth.* **7**(5): 506-531.
- Prodanović, R., S. Jovanović and Z. Vujčić (2001). "Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate." *Biotechnology Letters* **23**(14): 1171-1174.
- Qiang, S., F. Yubo, Y. Lijiang and G. Yi Qin (2012). "From protein denaturant to protectant: comparative molecular dynamics study of alcohol/protein interactions." *Journal of Chemical Physics* **136**(11): 115101 (115109 pp.)-115101 (115109 pp.)115101 (115109 pp.).
- Ragupathi, G., P. Damani, G. Srivastava, O. Srivastava, S. Sucheck, Y. Ichikawa and P. Livingston (2009). "Synthesis of sialyl Lewis^x (sLea, CA19-9) and construction of an immunogenic sLea vaccine." *Cancer Immunol Immunother* **58**(9): 1397-1405.

- Ramakrishnan, B., Balaji, P. V., Qasba, K. (2002). "Crystal structure of β 1,4-galactosyltransferase complex with UDP-Gal reveals an oligosaccharide acceptor binding site." *J Mol Biol* **318**: 491-502.
- Rao, J. H., L. Yan, J. Lahiri, G. M. Whitesides, R. M. Weis and H. S. Warren (1999). "Binding of a dimeric derivative of vancomycin to L-Lys-D-Ala-D-lactate in solution and at a surface." *Chemistry & Biology* **6**(6): 353-359.
- Rao, J. H., L. Yan, B. Xu and G. M. Whitesides (1999). "Using surface plasmon resonance to study the binding of vancomycin and its dimer to self-assembled monolayers presenting D-Ala-D-Ala." *Journal of the American Chemical Society* **121**(11): 2629-2630.
- Rao, M. B., A. Tanksale, M. Ghatge and V. Deshpande (1998). "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(3): 597-635.
- Rapoport, E., S. Khaidukov, O. Baidina, V. Bojenko, E. Moiseeva, G. Pasynina, U. Karsten, N. Nifant'ev, J. LePendu and N. Bovin (2003). "Involvement of the Gal β 1-3GalNac β structure in the recognition of apoptotic bodies by THP-1 cells." *Eur. J. Cell. Biol.* **82**(6): 295-302.
- Ravindranath, M. H., A. A. Amiri, P. M. Bauer, M. C. Kelley, R. Essner and D. L. Morton (1997). "Endothelial-selectin ligands sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) are differentiation antigens immunogenic in human melanoma." *Cancer* **79**(9): 1686-1697.
- Ravizzola, G., F. Pirali, I. Foresti and A. Turano (1987). "Comparison of the in vitro antibacterial activity of teicoplanin and vancomycin against gram-positive cocci." *Drugs under experimental and clinical research* **13**(4): 225-229.
- Rich, D. G., G. Papalia, P. Flynn, J. Furneisen, F. J. Muñoz, M. J. Hernáiz and D. G. Myszka (2009). "A global benchmark study using affinity-based biosensors." *Anal. Biochem.* **386**: 194-216.
- Rich, R. and D. Myszka (2000). "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis." *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 54-61.
- Rich, S. M., F. H. Leendertz, G. Xu, M. LeBreton, C. F. Djoko, M. N. Aminake, E. E. Takang, J. L. Dikko, B. L. Pike, B. M. Rosenthal, P. Formenty, C. Boesch, F. J. Ayala and N. D. Wolfe (2009). "The origin of malignant malaria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(35): 14902-14907.
- Röckendorf, N. and T. Lindhorst (2001). Glycodendrimers. *Dendrimers IV*. F. Vögtle and C. Schalley, Springer Berlin Heidelberg. **217**: 201-238.
- Romeo, G. (2012). "Thermal motions quantification of lysozyme in aqueous mixtures with different co-solvent: glycerol C₃H₅(OH)(3) , trehalose C₁₂H₂₂O₁₁ , sucrose C₁₂H₂₂O₁₁ , and a chaotropic agent CO(NH₂)(2) by osiris near-backscattering crystal analyser spectrometer." *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **106**(4): 893-900.
- Rostovtsev, V. V., L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless (2002). "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(14): 2596-2599.

- Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (2001). "Life in extreme environments." Nature **409**(6823): 1092-1101.
- Roy, R. (1996). "Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates." Curr Opin Struct Biol **6**(5): 692-702.
- Roy, R., F. Hernandez-Mateo and F. Santoyo-Gonzalez (2000). "Synthesis of persialylated beta-cyclodextrins." J Org Chem **65**(25): 8743-8746.
- Rubinstein, E., S. K. Cammarata, T. H. Oliphant and R. G. Wunderink (2001). "Linezolid (PNU-100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study." Clin. Infect. Dis. **32**(3): 402-412.
- Rudd, P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson and R. A. Dwek (2001). "Roles for glycosylation in the immune system." Science **291**: 2370-2376.
- Rudd, P. M., M. R. Wormald and R. A. Dwek (2004). "Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system." Trends Biotechnol. **22**(10): 524-530.
- Safina, G., I. B. Duran, M. Alasel and B. Danielsson (2011). "Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins." Talanta **84**(5): 1284-1290.
- Salameh, M. d., J. Wiegel, S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey (2007). Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. Advances in Applied Microbiology, Academic Press. **Volume 61**: 253-283.
- Salis, A., D. Meloni, S. Ligas, M. F. Casula, M. Monduzzi, V. Solinas and E. Dumitriu (2005). "Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance." Langmuir **21**(12): 5511-5516.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Navarro, M., A. Munoz, B. M. Illescas, J. Rojo and N. Martin (2011). "[60]Fullerene as multivalent scaffold: efficient molecular recognition of globular glycofullerenes by concanavalin A." Chemistry **17**(3): 766-769.
- Sánchez-Vicente, Y., A. Cabañas, J. A. R. Renuncio and C. Pando (2009). "Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol." J. Supercrit. Fluids **49**(2): 167-173.
- Sandoval, M. (2012). Nuevas estrategias sostenibles para la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados de interés biológico. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Madrid, Universidad Complutense.
- Sandoval, M., A. Cortés, C. Civera, J. Treviño, E. Ferreras, M. Vaultier, J. Berenguer, P. Lozano and M. J. Hernaiz (2012). "Efficient and selective enzymatic synthesis of *N*-Acetyl-Lactosamine in ionic liquid: a rational explanation." RSC Adv. **2**: 6306-6314.
- Sandoval, M., E. Ferreras, M. Pérez-Sánchez, J. Berenguer, J. V. Sinisterra and M. J. Hernaiz (2012). "Screening of strains and recombinant enzymes from *Thermus thermophilus* for their use in disaccharide synthesis." J. Mol. Cat. B: Enz. **74**: 162-169.

- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Santora, B. P., M. R. Gagné, K. G. Moloy and N. S. Radu (2001). "Porogen and cross-linking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization." Macromolecules **34**(3): 658-661.
- Sasaki, A., T. Ishimizu, R. Geyer and S. Hase (2005). "Synthesis of β -mannosides using the transglycosylation activity of endo- β -mannosidase from *Lilium longiflorum*." FEBS J. **272**(7): 1660-1668.
- Schafer, M., T. R. Schneider and G. M. Sheldrick (1996). "Crystal structure of vancomycin." Structure **4**(12): 1509-1515.
- Schauer, R. (1982). "Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids." Adv Carbohydr Chem Biochem **40**: 131-234.
- Schmidt, R. and R. Michel (1980). "Einfache synthese von α - und β -O-glycosylimidaten. Herstellung von glycosiden und disacchariden." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **19**, 731-732 **92**: 763-765.
- Schmidt, R. and R. Michel (1986). "Divinylglycole zur synthese von desoxyhexosen-synthese der D-bzw. L-Chalcose." Angewandte Chemie International Edition **98**: 213-236.
- Schmid, R. D. and R. Verger (1998). "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications." Angewandte Chemie International Edition **37**(12): 1608-1633.
- Schmidt, M. and U. T. Bornscheuer (2005). "High-throughput assays for lipases and esterases." Biomolecular Engineering **22**(1-3): 51-56.
- Schmidt, M. A., L. W. Riley and I. Benz (2003). "Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens." Trends Microbiol. **11**: 554-561.
- Schmidt, R. R. (1986). "New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides-are there alternatives to the Koenigs-Knorr method " Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**(3): 212-235.
- Schmidt, R. R. and E. Rücker (1980). "Stereoselective glycosidations of uronic acids." Tetrah. Lett. **21**(15): 1421-1424.
- Schroder, S., U. Schmidt, J. Thiem, J. Kowalczyk, M. Kunz and M. Vogel (2004). "Synthesis of oligosaccharides as potential novel food components and upscaled enzymatic reaction employing the beta-galactosidase from bovine testes." Tetrahedron **60**(11): 2601-2608.
- Schüttelkopf, A. and D. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. **60**(8): 1355-1363.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex and M. C. Peitsch (2003). "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server." Nucleic Acids Res. **31**(13): 3381-3385.
- Sears, P. and C.-H. Wong (1998). "Mechanism-based inhibition of carbohydrate-mediated biological recognitions." Chem. Commun.(11): 1161-1170.
- Seeberger, P. (2003). "Automated carbohydrate synthesis to drive chemical glycomics." Chem. Commun.: 1115-1121.

- Seeberger, P. H. (2008). "Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology - current status and future challenges." Carbohydr. Res. **343**: 1889-1896.
- Sellek, G. A. and J. B. Chaudhuri (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." Enzym. Microbiol. Tech. **25**(6): 471-482.
- Sheldon, R. (2001). "Catalytic reactions in ionic liquids." Chem. Commun.: 2399-2407.
- Sheldon, R. A. (2000). "Chimie/Chemistry." C.R. Acad. Sci. **3**: 541-551.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance." Advanced Synthesis & Catalysis **349**(8-9): 1289-1307.
- Sheldon, R. A., I. Arends and U. Hanefeld (2007). Green Chemistry and Catalysis. Weinheim, Wiley-VCH.
- Sheldon, R. A., R. M. Lau, M. J. Sorgedrager, F. van Rantwijk and K. R. Seddon (2002). "Biocatalysis in ionic liquids." Green Chem. **4**(2): 147-151.
- Sheldon, R. A. and F. van Rantwijk (2004). "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." Aust. J. Chem. **57**(4): 281-289.
- Sheldon, R. A. and F. van Rantwijk (2004). "Biocatalysis for Sustainable Organic Synthesis." Aust. J. Chem. **57**: 281-289.
- Shinohara, Y., Y. Hasegawa, H. Kaku and N. Shibuya (1997). "Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface." Glycobiology **7**(8): 1201-1208.
- Shirato, H., S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, Z. Xiaofan, T. Miyamura, T. Wakita, K. Ishii and N. Takeda (2008). "Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding." J. Virol. **82**(21): 10756-10767.
- Shur, B. D. (1993). "Glycosyltransferases as cell adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **5**: 854-863.
- Silva, Z., M. M. Sampaio, A. Henne, A. Bohm, R. Gutzat, W. Boos, M. S. da Costa and H. Santos (2005). "The high-affinity maltose/trehalose ABC transporter in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 also recognizes sucrose and palatinose." J Bacteriol **187**(4): 1210-1218.
- Singh, N. R., D. Narinesingh and G. Singh (2010). "Immobilization of β -galactosidase onto Sepharose and stabilization in room temperature ionic liquids." Journal of Molecular Liquids **152**(1-3): 19-27.
- Smith, E. A., W. D. Thomas, L. L. Kiessling and R. M. Corn (2003). "Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions." Journal of the American Chemical Society **125**(20): 6140-6148.
- Song, J., K. Abe, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, S. Yamaguchi and K. Nakanishi "Causes of the Production of Multiple Forms of β -Galactosidase by *Bacillus circulans*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **75**(2): 268-278.
- Sonogashira, K. (1991). Comprehensive Organic Synthesis: Volume 3. B. M. Trost, G. Pattenden and I. Fleming, Pergamon Press: 521.

- Sosio, M., S. Stinchi, F. Beltrametti, A. Lazzarini and S. Donadio (2003). "The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by nonomurea species." Chem Biol **10**(6): 541-549.
- Spieß, A., R. C. Schlothauer, J. Hinrichs, B. Scheidat and V. Kasche (1999). "pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of β -lactam hydrolysis." Biotech. Bioeng. **62**(3): 267-277.
- Spiwok, V., P. Lipovová, T. Skálová, E. Buchtelová, J. Hasek and B. Králová (2004). "Role of CH/ π interactions in substrate binding by *Escherichia coli* β -galactosidase." Carbohydr. Res. **339**(13): 2275-2280.
- Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." Science **224**: 1198-1206.
- Springer, G. F., P. R. Desai, W. Wise, S. C. Carlstedt, H. Tegtmeier, R. Stein and E. F. Scanlon (1990). "Pancarcinoma T and Tn epitopes: autoimmunogens and diagnostic markers that reveal incipient carcinomas and help establish prognosis." Immunol. Ser. **53**: 587-612.
- Srisomsap, C., J. Svasti, R. Surarit, V. Champattanachai, P. Sawangareetrakul, K. Boonpuan, P. Subhasitanont and D. Chokchaichamnankit (1996). "Isolation and characterization of an enzyme with beta-glucosidase and beta-fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre." J Biochem **119**(3): 585-590.
- Srivastava, G., Hindsgaul, O., Palcic, M.M. (1993). "Chemical synthesis and kinetic characterization of UDP-2-deoxy-D-lyxo-hexose ("UDP-2-deoxy-D-galactose"), a donor-substrate for β -(1-4)-D-galactosyltransferase." Carbohydr Res **245**: 137-144.
- Stackerbrandt, E., Kiedde, R.M. (2005). Genus *Cellulomonas*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2. M. Sneath, Sharpe and Holt. New York. USA, Springer.
- Stewart, R. J. and J. M. Boggs (1993). "A carbohydrate-carbohydrate interaction between galactosylceramide-containing liposomes and cerebroside sulfate-containing liposomes: dependence on the glycolipid ceramide composition." Biochemistry **32**(40): 10666-10674.
- Stone, J. E., J. C. Phillips, P. L. Freddolino, D. J. Hardy, L. G. Trabuco and K. Schulten (2007). "Accelerating molecular modeling applications with graphics processors." Journal of computational chemistry **28**(16): 2618-2640.
- Suarez, P. A. Z., S. Einloft, J. E. L. Dullius, R. F. de Souza and J. Dupont (1998). "Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1- n-butyl-3-methylimidazolium cation." J. Chim. Phys. **95**(7): 1626-1639
- Suda, Y., A. Arano, Y. Fukui, S. Koshida, M. Wakao, T. Nishimura, S. Kusumoto and M. Sobel (2006). "Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: an improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions." Bioconjugate Chemistry **17**(5): 1125-1135.
- Svec, F. (2004). "Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths." Journal of Separation Science **27**(10-11): 747-766.

- Svedendahl, M., K. Hult and P. Berglund (2005). "Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase." Journal of the American Chemical Society **127**: 17988-17989.
- Takada, A., K. Ohmori, T. Yoneda, K. Tsuyuoka, A. Hasegawa, M. Kiso and R. Kannagi (1993). "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." Cancer Res **53**(2): 354-361.
- Takahashi, S., Y. Kuroyama, K. Sonogashira and N. Hagihara (1980). "A Convenient Synthesis of Ethynylarenes and Diethynylarenes." Synthesis **1980**(08): 627-630.
- Takakura, Y., H. Tsukamoto and T. Yamamoto (2007). "Molecular cloning, expression and properties of an alpha/beta-Galactoside alpha2,3-sialyltransferase from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16." J Biochem **142**(3): 403-412.
- Taqieddin, E. and M. Amiji (2004). "Enzyme immobilization in novel alginate: chitosan core-shell microcapsules." Biomaterials **25**(10): 1937-1945.
- Tietze, L., F. Fischer and R. Guder (1982). "Stereoselective synthesis of protected 1-*O*-trimethylsilyl- α -D-glucopyranoside." J. Synthesis: 946.
- Tischer, W. and V. Kascher (1999). "Immobilized enzymes: crystals or carriers?" Trends Biotechnol. **17**: 326-335.
- Tornøe, C. W., C. Christensen and M. Meldal (2002). "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides." J Org Chem **67**(9): 3057-3064.
- Torres, P. and F. Batista-Viera (2012). "Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports." J. Mol. Cat. B: Enz. **74**(3-4): 230-235.
- Torres, R., C. Mateo, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, J. M. Palomo, J. M. Guisan and R. Fernández-Lafuente (2003). "A novel heterofunctional epoxy-amino sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*." Biotechnol. Prog. **19**(3): 1056-1060.
- Trincone, A. and A. Giordano (2006). "Glycosyl hydrolases and glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharides." Curr. Org. Chem. **10**(10): 1163-1193.
- Tsukamoto, H., Y. Takakura and T. Yamamoto (2007). "Purification, cloning, and expression of an alpha/beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase from a luminous marine bacterium, *Photobacterium phosphoreum*." J Biol Chem **282**(41): 29794-29802.
- Tsuzuki, S., H. Tokuda, K. Hayamizu and M. Watanabe (2005). "Magnitude and directionality of interaction in ion pairs of ionic liquids: relationship with ionic conductivity." J. Phys. Chem. B **109**(34): 16474-16481.
- Tu, M., X. Zhang, A. Kurabi, N. Gilkes, W. Mabee and J. Saddler (2006). "Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis." Biotechnology Letters **28**(3): 151-156.
- Turnbull, W. B. and J. F. Stoddart (2002). "Design and synthesis of glycodendrimers." J Biotechnol **90**(3-4): 231-255.

- Turner, P., D. Svensson, P. Adlercreutz and E. N. Karlsson (2007). "A novel variant of *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation." Journal of Biotechnology **130**(1): 67-74.
- Tusnady, G. E. and I. Simon (1998). "Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction." J Mol Biol **283**(2): 489-506.
- Ueki, A., Y. Takano, A. Kobayashi, Y. Nakahara and H. Hojo (2010). "Solid-phase synthesis of glycopeptide carrying a tetra-*N*-acetyllactosamine-containing core 2 deca-saccharide." Tetrahedron **66**(9): 1742-1759.
- Ugorski, M. and A. Laskowska (2002). "Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells." Acta Biochim Pol **49**(2): 303-311.
- Unverzagt, C. (2003). "Synthesis of a core trisaccharide as a versatile building block for *N*-glycans and glycoconjugates." Chemistry - A European Journal **9**: 1369-1376.
- Uppenberg, J., N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen and T. A. Jones (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." Biochemistry **34**(51): 16838-16851.
- Uppoor, R. and P. J. Niebergall (1996). "beta-D(+) glucose-glucose oxidase-catalase for use as an antioxidant system." Pharm Dev Technol **1**(2): 127-134.
- Vaidya, B. K., G. C. Ingavle, S. Ponrathnam, B. D. Kulkarni and S. N. Nene (2008). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles." Bioresource Technology **99**(9): 3623-3629.
- Van den Akker, F., E. Steensma and W. Hol (1996). "Tumor marker disaccharide D-Gal- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc complexed to heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*." Prot. Sci. **5**: 1184-1188.
- van den Burg, B. (2003). "Extremophiles as a source for novel enzymes." Current Opinion in Microbiology **6**(3): 213-218.
- van Rantwijk, F., R. M. Lau and R. A. Sheldon (2003). "Biocatalytic transformations in ionic liquids." Trends Biotechnol. **21**(3): 131-138.
- van Rantwijk, F. and R. A. Sheldon (2007). "Biocatalysis in ionic liquids." Chem. Rev. **107**(6): 2757-2785.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.
- Varki, A. (2006). "Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution." Cell **126**(5): 841-845.
- Vasella, A., G. J. Davies and M. Bohm (2002). "Glycosidase mechanisms." Curr. Opin. Chem. Biol. **6**(5): 619-629.
- Vetere, A., M. Miletich, M. Bosco and S. Paoletti (2000). "Regiospecific glycosidase-assisted synthesis of lacto-*N*-biose I and (Gal β 1-3GlcNAc) and

- 3'-sialyl-lacto-*N*-biose I (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc)." *Eur. J. Biochem.* **267**(4): 942-949.
- Vetere, A. and S. Paoletti (1996). "High-yield synthesis of *N*-acetylglucosamine by regioselective transglycosylation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**(1): 6-13.
- Vetere, A. and S. Paoletti (1998). "Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*." *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1380**(2): 223-231.
- Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**(1): 1-43.
- Vivian, J. T. and P. R. Callis (2001). "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins." *Biophys. J.* **80**(5): 2093-2109.
- Vocadlo, D. J. and G. J. Davies (2008). "Mechanistic insights into glycosidase chemistry." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**(5): 539-555.
- Walsh, C. T. and M. A. Fischbach (2009). "New Ways to Squash Superbugs." *Scientific American* **301**(1): 44-51.
- Walsh, C. T., S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad and Z. Wu (1996). "Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story." *Chem Biol* **3**(1): 21-28.
- Wang, C. C., J. C. Lee, S. Y. Luo, S. S. Kulkarni, Y. W. Huang, C. C. Lee, K. L. Chang and S. C. Hung (2007). "Regioselective one-pot protection of carbohydrates." *Nature* **446**(7138): 896-899.
- Wang, P. G. (2007). "Sugars synthesized in a snap." *Nat. Chem. Biol.* **3**(6): 309-310.
- Wang, Y.-S., D. Liu and D. F. Wyss (2004). "Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening." *Magn. Reson. Chem.* **42**(6): 485-489.
- Wang, Y. and F. Caruso (2005). "Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation." *Chemistry of Materials* **17**(5): 953-961.
- Wasserscheid, P. and W. Keim (2000). "Ionic liquids: new "solutions" for transition metal catalysis." *Angewandte Chemie International Edition* **39**(21): 3772-3789.
- Wasserscheid, P. and T. Welton, Eds. (2003). *Ionic liquids in synthesis*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
- Weijers, C. A. G., M. C. R. Franssen and G. M. Visser (2008). "Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides." *Biotechnol. Adv.* **26**(5): 436-456.
- Weiss, H. and C. Unverzagt (2003). "Highly branched oligosaccharides: a general strategy for the synthesis of multiantennary *N*-glycans with a bisected motif." *Angew. Chem. Int. Edit.* **42**: 4261-4263.
- Welton, T. (2004). "Ionic liquids in catalysis." *Coord. Chem. Rev.* **248**(21-24): 2459-2477.
- Wen, X., Y. Yuan, D. A. Kuntz, D. R. Rose and B. M. Pinto (2005). "A combined STD-NMR/Molecular modeling protocol for predicting the binding modes of

- the glycosidase inhibitors kifunensine and salacinol to Golgi α -Mannosidase II." Biochem. **44**(18): 6729-6737.
- Wende, M. and J. A. Gladysz (2003). "Fluorous catalysis under homogeneous conditions without fluorous solvents: A "Greener" catalyst recycling protocol based upon temperature-dependent solubilities and liquid/solid phase separation." Journal of the American Chemical Society **125**(19): 5861-5872.
- Wiederschain, G. Y. and A. A. Prokopenkov (1973). " β -d-Galactosidase and β -d-fucosidase of pig kidney." Archives of Biochemistry and Biophysics **158**(2): 539-543.
- Wilstermann, M. and G. Magnusson (1995). "Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the β -d-Gal p-(1 \rightarrow 3)- β - and - β -d-Gal pNAc groups." Carb. Res. **272**(1): 1-7.
- Williams, D. H. and B. Bardsley (1999). "The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria." Angewandte Chemie-International Edition **38**(9): 1173-1193.
- Williams, D. H., A. J. Maguire, W. Tsuzuki and M. S. Westwell (1998). "An analysis of the origins of a cooperative binding energy of dimerization." Science **280**(5364): 711-714.
- Withers, S. G. and R. Aebersold (1995). "Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases." Protein Sci. **4**(3): 361-372.
- Wolfson, A., C. Dlugy and Y. Shotland (2007). "Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities." Environ. Chem. Lett. **5**(2): 67-71.
- Won, K., S. Kim, K.-J. Kim, H. W. Park and S.-J. Moon (2005). "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads." Process Biochem. **40**(6): 2149-2154.
- Wong, C.-H., Haynie, S. L., Whitesides, G. M. (1982). "Enzyme-catalyzed synthesis of *N*-acetylactosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose." J Org Chem **47**: 5416-5418.
- Wong, C.-H., Ichikawa, Y., Krach, T., Gautheron-Le Narvor, C., Look, G. C. (1991). "Probing the acceptor specificity of β -1,4-galactosyltransferase for the development of enzymatic synthesis of novel oligosaccharides." J Am Chem Soc **113**(21): 8137-8145.
- Xiang, J., A. Orita and J. Otera (2002). "Fluorous biphasic esterification directed towards ultimate atom efficiency." Angewandte Chemie International Edition **41**(21): 4117-4119.
- Xiao, C., A. Rehman and X. Zeng (2012). "Dynamics of redox processes in ionic liquids and their interplay for discriminative electrochemical sensing." Analytical Chemistry **84**(3): 1416-1424.
- Xie, J., A. Okano, J. G. Pierce, R. C. James, S. Stamm, C. M. Crane and D. L. Boger (2012). "Total Synthesis of [Psi[C(=S)NH]Tpg(4)]Vancomycin Aglycon, [Psi[C(=NH)NH]Tpg(4)]Vancomycin Aglycon, and Related Key Compounds: Reengineering Vancomycin for Dual D-Ala-D-Ala and D-Ala-D-Lac Binding." J Am Chem Soc **134**(2): 1284-1297.

- Xiong, A. S., R. H. Peng, J. Zhuang, J. Davies, J. Zhang and Q. H. Yao (2012). "Advances in directed molecular evolution of reporter genes." Crit Rev Biotechnol **32**(2): 133-142.
- Yamamoto, T., Y. Hamada, M. Ichikawa, H. Kajiwarra, T. Mine, H. Tsukamoto and Y. Takakura (2007). "A beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase produced by a marine bacterium, *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145, is active at pH 8." Glycobiology **17**(11): 1167-1174.
- Yan, F., S. Mehta, E. Eichler, W. Wakarchuk and M. Whitfield Dennis (2004). Chemoenzymatic synthesis of lactosamine and $\alpha(2\rightarrow3)$ sialylated lactosamine building blocks. Synthesis of carbohydrates through biotechnology, American Chemical Society. **873**: 53-72.
- Yarema, K. J. and C. R. Bertozzi (1998). "Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents." Curr. Opin. Chem. Biol. **2**(1): 49-61.
- Yegani, M. and D. R. Korver (2013). "Effects of corn source and exogenous enzymes on growth performance and nutrient digestibility in broiler chickens." Poult Sci **92**(5): 1208-1220.
- Yokoyama, A., Y. Shizuri, T. Hoshino and G. Sandmann (1996). "Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*." Arch. Microbiol. **165**: 342-345.
- Yoon, J. H. and D. McKenzie (2005). "A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures." Enzym. Microbiol. Tech. **36**(4): 439-446.
- Yu, H., H. A. Chokhawala, S. Huang and X. Chen (2006). "One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities." Nat Protoc **1**(5): 2485-2492.
- Yu, H., V. Thon, K. Lau, L. Cai, Y. Chen, S. Mu, Y. Li, P. G. Wang and X. Chen (2010). "Highly efficient chemoenzymatic synthesis of $\beta(1\rightarrow3)$ -linked galactosides." Chem. Commun. **46**(40): 7507-7509.
- Zeng, X. and H. Uzawa (2005). "Convenient enzymatic synthesis of a *p*-nitrophenyl oligosaccharide series of sialyl *N*-acetylglucosamine, sialyl Le^x and relevant compounds." Carbohydr. Res. **340**(16): 2469-2475.
- Zeng, Y., J. Wang, B. Li, S. Hauser, H. Li and L.-X. Wang (2006). "Glycopeptide synthesis through endo-glycosidase catalyzed oligosaccharide transfer of sugar oxazolines: probing substrate structural requirement." Chemistry - A European Journal **12**(12): 3355-3364.
- Zhanel, G. G., D. Calic, F. Schweizer, S. Zelenitsky, H. Adam, P. R. S. Lagace-Wiens, E. Rubinstein, A. S. Gin, D. J. Hoban and J. A. Karlowsky (2010). "New Lipoglycopeptides A Comparative Review of Dalbavancin, Oritavancin and Telavancin." Drugs **70**(7): 859-886.
- Zhanel, G. G., S. Trapp, A. S. Gin, M. DeCorby, P. R. Lagace-Wiens, E. Rubinstein, D. J. Hoban and J. A. Karlowsky (2008). "Dalbavancin and telavancin: novel lipoglycopeptides for the treatment of Gram-positive infections." Expert Rev Anti Infect Ther **6**(1): 67-81.

- Zhao, H., G. A. Baker, Z. Song, O. Olubajo, L. Zanders and S. M. Campbell (2009). "Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation." *J. Mol. Cat. B: Enz.* **57**(1-4): 149-157.
- Zhou, X. X., Y. B. Wang, Y. J. Pan and W. F. Li (2008). "Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins." *Amino Acids* **34**(1): 25-33.